



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IZOLACE A PRŮKAZ DNA Z ROSTLIN VÝZNAMNÝCH V  
POTRAVINÁŘSTVÍ**

ISOLATION AND DETECTION OF DNA FROM PLANT SPECIES IMPORTANT FOR FOOD PRODUCTION

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Matúš Orel**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**

**BRNO 2019**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1309/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Matúš Orel**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**

### Název diplomové práce:

Izolace a průkaz DNA z rostlin významných v potravinářství

### Zadání diplomové práce:

Cílem práce je nalezení optimální metody pro izolaci DNA z potravinových produktů rostlinného původu. Bude porovnána mikro metoda pomocí magnetických částic s klasickou metodou CTAB. Pomocí bioinformatických nástrojů budou nalezena cílová místa pro restriční endonukleázy v oblasti genu 35S rRNA, které budou využity ke kvalitativní analýze PCR produktů z mrkve, papriky, řepy a brokolice.

### Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Matúš Orel  
student(ka)

-----  
RNDr. Aleš Kovařík, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V potravinárstve je veľmi dôležité, aby sa dbalo na kvalitu, bezpečnosť a organoleptické vlastnosti dodávaných produktov. Z tohoto dôvodu sa musia potraviny kontrolovať. Avšak nie všetky informácie vieme zistiť pomocou konvenčných techník ako sú napríklad imunologické testy, chromatografické techniky a podobne. Pre tieto prípady, kedy nezaberajú tradičné postupy, je možné použiť techník na báze DNA. Medzi nimi je najznámejšia technika PCR.

Cieľom diplomovej práce bolo vyizolovať DNA zo vzoriek zeleniny (brokolica, repa červená, mrkva a paprika). DNA sa izolovala pomocou metódy s magnetickými časticami a s tradičnou metódou CTAB. S obidvoma metódami sa podarilo izolovať DNA zo vzoriek zeleniny v kvalite a v koncentrácii vhodnej pre PCR, kde sa amplifikoval úsek génu 35S rDNA (presnejšie úsek okolo oblasti 18S-ITS-5,8S o približnej veľkosti 700 bp). Po amplifikácii sa PCR produkty podrobili reštrikčným reakciám a výsledky sa porovnali s bioinformatickou analýzou. Týmto krokmi sa podarilo nájsť vhodné enzýmy pre odlišenie PCR produktov z testovaných druhov zeleniny.

## **ABSTRACT**

In the food industry, it is very important to take care of the quality, safety and organoleptic properties of the products supplied. For this reason, food must be checked. However, not all information can be found using conventional techniques such as immunoassays, chromatographic techniques, etc. DNA-based techniques can be used for these cases where traditional procedures are insufficient. Among them, the best known technique is PCR.

The aim of the thesis was to isolate DNA from vegetable samples (broccoli, beetroot, carrot and pepper). DNA was isolated using the magnetic particle method and the traditional CTAB method. Both methods were able to isolate the DNA from the vegetable samples in quality and at a concentration suitable for PCR, where the 35S rDNA gene region was amplified (more precisely about 700 bp of the 18S-ITS1-5,8S region). After amplification, the PCR products were subjected to restriction reactions and the results compared to bioinformatic analysis. These steps have succeeded in finding suitable enzymes for differentiation of PCR products from the tested vegetable species.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Izolácia rastlinnej DNA, magnetické častice, metóda CTAB, polymerázová reťazová reakcie (PCR), reštrikčné štiepenie, bioinformatická analýza

## **KEYWORDS**

Isolation of plant DNA, magnetic particles, CTAB method, polymerase chain reaction (PCR), restriction cleavage, bioinformatics analysis

OREL, Matúš. *Izolace a průkaz DNA z rostlin významných v potravinářství*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115217>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Aleš Kovařík.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citoval správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## *Podakovanie:*

*Rád by som touto formou poďakoval pánovi RNDr. Alešovi Kovaříkovi a paní doc. RNDr. Alene Španové, za ochotu, láskavosť, odborné a cenné rady pri zapracovaní tejto diplomovej práce. Vrelé poďakovanie patrí taktiež mojej rodine a priateľom za podporu a trpezlivosť behom môjho štúdia.*

## Obsah

1.	ÚVOD.....	8
2.	TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
2.1	Potraviny zo zeleniny .....	9
2.1.1	Brokolica – <i>Brassica oleracea</i> .....	9
2.1.2	Repa červená – <i>Beta vulgaris</i> .....	9
2.1.3	Mrkva obecná – <i>Daucus carota</i> .....	10
2.1.4	Paprika siata – <i>Capsicum annuum</i> .....	11
2.1.5	Kontrola kvality potravín – metódy .....	11
2.2	Izolácia DNA.....	11
2.2.1	Využívania magnetických častíc.....	12
2.2.2	Izolácia DNA pomocou magnetických častíc.....	13
2.3	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA.....	13
2.3.1	Stanovenie koncentrácie DNA – UV Spektrofotometricky.....	14
2.3.2	Stanovenie koncentrácie DNA – Fluorimetricky.....	14
2.4	DNA barcoding .....	14
2.4.1	ITS oblasť .....	14
2.5	PCR .....	15
2.5.1	Základné zložky PCR .....	15
2.5.2	Cykly PCR .....	16
2.6	Restrikčné enzýmy .....	16
2.7	Gélová elektroforéza DNA.....	17
3.	CIELE PRÁCE .....	18
4.	EXPERIMENÁLNA ČASŤ .....	19
4.1	Materiály .....	19
4.1.1	Vzorky.....	19
4.1.2	Chemikálie .....	19
4.1.3	Komponenty pre PCR .....	19
4.1.4	Enzýmy použité pre reštrikčnú analýzu .....	20
4.1.5	Prístroje .....	20
4.2	Metódy .....	21
4.2.1	Izolácia DNA použitím magnetických častíc .....	21
4.2.2	Izolácia DNA metódou CTAB.....	21
4.3	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA spektrofotometricky .....	22
4.4	Stanovenie koncentrácie DNA fluorometrom.....	22
4.4.1	Kalibrácia Quantus fluorometra.....	22

4.4.2	Meranie vzoriek zeleniny.....	23
4.5	Príprava PCR zmesi a PCR .....	23
4.6	Gélová elektroforéza pre detekciu produktov PCR (amplikónov) a ich reštrikčných fragmentov.....	24
4.7	Štiepenie DNA za pomoci reštrikčných endonukleáz.....	24
4.8	Bioinformatická analýza .....	24
5.	VÝSLEDKY.....	25
5.1	Izolovanie DNA brokolice ( <i>Brassica oleracea</i> ) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR.....	25
5.1.1	Izolácia DNA z brokolice .....	25
5.1.2	PCR a detekcia produktov DNA.....	25
5.1.3	Reštrikčná analýza .....	26
5.1.4	Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) brokolice ....	26
5.2	Izolovanie DNA repy červenej ( <i>Beta vulgaris</i> ) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR.....	28
5.2.1	Izolácia DNA z repy červenej .....	28
5.2.2	PCR a detekcia produktov PCR.....	29
5.2.3	Reštrikčná analýza .....	30
5.2.4	Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) repy červenej	30
5.3	Izolovanie DNA mrkvy obecnej ( <i>Daucus carota</i> ) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR.....	32
5.3.1	Izolácia DNA z mrkvy obecnej.....	32
5.3.2	PCR a detekcia produktov PCR.....	32
5.3.3	Reštrikčná analýza .....	32
5.3.4	Bioinformatická analýza amplikónu (sekvencie rDNA) mrkvy obecnej....	32
5.4	Izolovanie DNA papriky siatej ( <i>Capsicum annuum</i> ) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR.....	34
5.4.1	Izolácia DNA z papriky .....	34
5.4.2	PCR a detekcia produktov PCR.....	34
5.4.3	Reštrikčná analýza .....	34
5.4.4	Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) papriky siatej	34
5.5	Izolácia a stanovenie koncentrácie DNA brokolice, červenej repy, papriky a mrkvy (metóda s CTAB). .....	36
5.6	Amplifikácia v PCR a štiepenie produktov PCR (metóda CTAB) .....	36
5.6.1	Brokolica.....	36
5.6.2	Repa červená.....	40
5.6.3	Mrkva obecná.....	43
5.6.4	Paprika .....	46

5.7	Porovnanie reštrikčnej analýzy produktov PCR .....	49
5.8	Porovnanie metód izolácie DNA.....	50
6.	DISKUSIA.....	51
6.1	Izolácia DNA vhodná pre PCR .....	51
6.1.1	Izolácia DNA metódou magnetických častíc.....	51
6.1.2	Izolácia DNA metódou CTAB.....	51
6.1.3	Porovnanie metód izolácie .....	51
6.2	PCR, detekcia produktov DNA a ich štiepenie .....	52
6.3	Bioinformatická analýza PCR produktov ( <i>in silico</i> analýza).....	52
6.4	Celkové porovnanie analýz medzi produktami PCR .....	53
7.	ZÁVER.....	54
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	55
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	59

## 1. ÚVOD

Vysoko kvalitné suroviny sú základom pre produkciu potravín s primeranou nutričnou hodnotou a žiaducou chuťou. Potravinársky priemysel vyvinul niekoľko technologických (napr. mikrofiltrácia, ultra-tepelná úprava) a biotechnologických (napr. fermentácia) procesov na zachovanie a zvýšenie organoleptických vlastností svojich produktov. Vlády majú rozdielne národné smernice pre výrobu a uchovávanie potravín. Kontroly kvality sa vykonávajú rôznymi laboratórnymi testami, ktoré predstavujú povinný východiskový bod pre riadny systém sledovateľnosti potravín. Definícia testov, ktoré by sa mali použiť pri hodnotení kvality a bezpečnosti potravín, je zodpovednosťou niekoľkých nezávislých agentúr, ako napríklad Americký úrad pre potraviny a liečivá alebo Európsky úrad pre bezpečnosť potravín. Validácia autenticity potravín závisí predovšetkým od analýzy proteínov alebo sekvencií DNA [1] .

V roku 2003 vyvinuli výskumníci z University of Guelph (Kanada) nový identifikačný systém založený na metóde na báze PCR, nazvaná DNA barcoding. Tento prístup je založený na analýze variability v štandardnej oblasti genómu nazvanej „DNA barcode“ [2]. Okrem autenticity potravín sa môže využívať na stanovenie biodiverzity a jej identifikáciu [3], na podporu vlastníctva alebo práva duševného vlastníctva [4], umožňuje odhaliť kryptické druhy [5] a využíva sa aj v ekologických a environmentálnych genomických štúdiách [6].



## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Potraviny zo zeleniny

Zelenina a ovocie sú všeobecne propagované ako zdravé. Zahŕňajú rôznorodú skupinu rastlinných potravín, ktoré sa veľmi líšia v obsahu energie a živín. Okrem toho, ovocie a zelenina dodávajú vlákninu. Prijem vlákniny je spojený s nižším výskytom kardiovaskulárnych ochorení a obezity. Zelenina a ovocie tiež obsahujú vitamíny, minerály a sú zdrojom fytochemikálií (ktoré fungujú ako antioxidanty), fytoestrogény, protizápalové činidlá [7]. V tejto diplomovej práci sa budeme sústreďovať iba na zeleninu, z nej sme si vybrali bežne dostupné rastlinné druhy brokolicu, repu červenú, mrkvu obecnú a papriku siatu.

#### 2.1.1 Brokolica – *Brassica oleracea*

Brokolica je plodina, ktorá obľubuje studenšie počasie v teplotnom rozmedzí 15-23 °C. Pri teplotách vyšších ako je 25 °C sa znehodnocuje kvalita plodiny (napr. zväčšujúce sa kvetenstvo pri teplotách nad 30 °C) a aj jej výťažok [8,9]. Brokolica je dôležitá zelenina, známa svojím vysokým obsahom zlúčenín podporujúcich zdravie. Do týchto zlúčenín patria antioxidanty, polyfenoly, glukozinoláty, sulforafány a minerály ako selén, vápnik, horčíkom fosfor, draslík a sodík. Tieto látky odporujú imunitný systém, prevenciu voči rakovine a kardiovaskulárnych ochorení. Brokolica sa zároveň ráta ako funkčná potravinu, pretože obsah niektorých prirodzene sa vyskytujúcich zložiek je vo zvýšenej koncentrácii v porovnaní s tradičným jedlom [10]. V tab. 1 je uvedená produkcia brokolice vo svete, kde sú uvedené okrem najlepších piatich krajín aj Česko a Slovensko.

Tab. 1 Produkcia brokolice vo svete (započítané spolu s karfiolom zo stránky [www.factfish.com](http://www.factfish.com) pre rok 2017)

Poradie	Krajina	Množstvo výroby (v tonách)
1.	Čína	10 449 387
2.	India	8 557 000
3.	USA	1 306 620
4.	Španielsko	688 778
5.	Mexiko	685 463
63.	Česko	3 857
82.	Slovensko	519
	Celkové množstvo vo svete	25 984 758

#### 2.1.2 Repa červená – *Beta vulgaris*

Repa červená sa ako potravinu využíva približne od roku 1000 pred naším letopočtom v oblasti Stredozemného mora. Rimanovia využívali listy na jedlo a korene na lekárske účely [11]. Táto repa patrí do rodu *Beta* a tento rod sa delí na dve skupiny: na pestovanú a na voľne rastúcu morskú. Repa červená patrí do pestovanej skupiny spolu s cukrovou repou a kŕmnu repou [12]. Tento druh zeleniny predstavuje vysoko obnoviteľný a lacný zdroj živín. Môže byť pestovaná v pôdach s malým množstvom vody a svetla. Repa červená je bohatá na sacharidy, vlákninu, bielkoviny, polyfenoly a minerály ako sú sodík, draslík, vápnik a železo. Tiež obsahuje

sekundárne metabolity (nazývané betalaíny), ktoré sa využívajú v potravinárstve ako farbivá a vykazujú protirakovinovú aktivitu. Nachádzajú sa tu aj vitamíny ako C, E, a vitamíny skupiny B. Kalorický príspevok je 20 kcal na 100 g čerstvej repy [11]. V tab. 2 je uvedená produkcia repy červenej vo svete, kde sú uvedené okrem najlepších piatich krajín aj Česko a Slovensko.

Tab. 2 Produkcia repy vo svete (zo stránky [www.factfish.com](http://www.factfish.com) pre rok 2017)

Poradie	Krajina	Množstvo výroby (tonách)
1.	Rusko	51 933 913
2.	Francúzsko	34 381 064
3.	Nemecko	34 059 900
4.	USA	32 046 300
5.	Turecko	20 828 316
15.	Česko	4 399 521
27.	Slovensko	1 230 793
	Celkové množstvo vo svete	301 015 696

### 2.1.3 Mrkva obecná – *Daucus carota*

Mrkva je jedna z najpopulárnejšou koreňovou zeleninou, ktorá sa pestuje po celkom svete a je najdôležitejším zdrojom karotenoidov pre západné krajiny vrátane USA. Obsah vlhkosti v mrkve sa pohybuje od 86 do 89 %. Ďalšie zložky sú, sacharidy, vláknina, karotény (hlavne beta karotén) a minerály ako vápnik, sodík, draslík, mangán, fosfor, železo a iné. Mrkva obsahuje aj vitamíny typu C, B1, B2, B3a B9. Energetická hodnota je 30 kcal na 100 g čerstvej mrkvy. Kvôli obsahu týchto zložiek, sa mrkva môže využívať proti rakovine, ischemickej chorobe srdca, oxidačnom strese a aj ako antioxidant. Beta karotén sa zároveň môže využívať ako prídavná látka do tort, chlebov a iných výrobkov [13] V tab. 3 je uvedená produkcia mrkvy vo svete, kde sú uvedené okrem najlepších piatich krajín aj Česko a Slovensko.

Tab. 3 Produkcia mrkvy vo svete (započítané spolu s krmnou repou zo stránky [www.factfish.com](http://www.factfish.com) pre rok 2017)

Poradie	Krajina	Množstvo výroby (v tonách)
1.	Čína	20 371 421
2.	Uzbekistan	2 249 733
3.	Rusko	1 805 787
4.	USA	1 540 280
5.	Veľká Británia	957 036
63.	Česko	33 555
94.	Slovensko	5 730
	Celkové množstvo vo svete	42 831 958

### 2.1.4 Paprika siata – *Capsicum annuum*

Paprika je považovaná za jednu z najobľúbenejších a najvýživnejších rastlín. Pôvod papriky je južná Amerika (hlavne Brazília), z ktorej sa vďaka Kolumbusovi dostala do Európy a potom portugalskými obchodníkmi do Afriky, blízkeho východu a Ázie. Paprika obsahuje veľký počet zdravých látok ako sú uhľohydráty, minerály (napr. zinok, draslík, sodík, železo a iné) a antioxidanty [14]. Zároveň je aj bohatým zdrojom vitamínov (viac ako paradajky) ako sú vitamín A, B6, B9 a C [15]. V tab. 4 je uvedená produkcia papriky vo svete, kde sú uvedené okrem najlepších piatich krajín aj Česko a Slovensko.

Tab. 4 Produkcia papriky vo svete (započítané spolu s chilli papričkami zo stránky [www.factfish.com](http://www.factfish.com) pre rok 2017)

Poradie	Krajina	Množstvo výroby (v tonách)
1.	Čína	17 821 238
2.	Mexiko	3 296 875
3.	Turecko	2 608 172
4.	Indonézia	2 359 441
5.	Španielsko	1 277 908
81.	Česko	8 735
86.	Slovensko	6 163
	Celkové množstvo vo svete	36 092 631

### 2.1.5 Kontrola kvality potravín – metódy

Metódy na báze proteínov zahŕňajú imunologické testy, elektroforetické a chromatografické techniky, ako je HPLC a TLC. Sú účinné pri testovaní čerstvých produktov, avšak keď sa uplatňujú na analýzu silne spracovaných potravín má táto metóda veľmi nízku účinnosť. V týchto prípadoch sú metódy na báze DNA účinnejšie. Okrem toho je DNA informatívnejšia ako proteíny a dá sa ľahko extrahovať aj v prítomnosti malých stôp organických materiálov. Vo všeobecnosti metódy na báze DNA používajú špecifické sekvencie DNA ako markery a môžu byť rozdelené na markery založené na hybridizácii a na markery založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Pri metódach založených na hybridizácii sa druhovo špecifické profily DNA zisťujú hybridizáciou DNA štiepanej reštrikčnými enzýmami a porovnaním so značenými sondami (DNA fragmenty známeho pôvodu alebo sekvencie). Metódy na báze PCR zahŕňajú amplifikáciu cieľových lokusov s použitím špecifických alebo ľubovoľných primérov a enzýmu DNA polymerázy. Fragmenty sa potom separujú elektroforeticky a detegujú sa rôznymi spôsobmi [1].

## 2.2 Izolácia DNA

Izolácia čistej, neporušenej a vysoko kvalitnej DNA je veľmi dôležitá pre všetky molekulárne štúdie. Izolácia DNA z rastlín je však zvyčajne ohrozená nadmernou kontamináciou sekundárnymi metabolitmi. Metódy izolácie DNA musia byť prispôsobené každému rastlinnému druhu a dokonca aj každému rastlinnému tkanivu z dôvodu prítomnosti týchto metabolitov na rozdiel od zvierat a mikróbov [16]. Hľadanie účinnejšieho spôsobu extrakcie DNA s vyššou kvalitou a výťažkom viedlo k vývoju mnohých protokolov na izoláciu

DNA z rastlín obsahujúcich vysoké hladiny sekundárnych metabolitov[17]. Mnoho faktorov môže spôsobiť degradáciu DNA počas extrakcie. Degradácia DNA v dôsledku endonukleáz je jedným z takých problémov, ktoré sa vyskytujú pri izolácii a čistení DNA s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorá priamo alebo nepriamo interferuje s enzymatickými reakciami [18]. Polysacharidy môžu byť tiež obzvlášť problematické, ak sú prítomné vo vzorkách DNA, pretože ich prítomnosť môže tiež inhibovať enzymatickú aktivitu. Ukázalo sa, že prítomnosť polysacharidov inhibuje aktivitu Taq polymerázy a aktivitu reštrikčných enzýmov. Prítomnosť polysacharidov vo vzorke DNA je charakterizovaná tvorbou vysoko viskózneho roztoku. Problémy spôsobujú taktiež polyfenoly. Oxidovaná forma polyfenolov sa môže kovalentne viazať na DNA, ktorá dostáva hnedú farbu, čo znemožňuje molekulárne štúdie[17].

Medzi tradičné izolácie DNA môžeme považovať rôzne metódy na báze využívania CTAB lyzačného pufru s fenolovou extrakciou. Okrem týchto tradičných extrakčných prístupov je dostupných aj niekoľko komerčných súprav (kits) na extrakciu genómovej DNA z rastlín s dostatočnou kvalitou [19].

### **2.2.1 Využívania magnetických častíc**

V posledných rokoch sa úspešne využíva separácia biomolekúl ( aj DNA) na pevných časticiach, prevažne magnetických. Technológia magnetickej separácie, využívajúca magnetické častice, je rýchla a jednoduchá metóda pre citlivé a spoľahlivé zachytávanie špecifických proteínov, genetického materiálu a iných biomolekúl. Technika ponúka výhodu, pokiaľ ide o podrobenie analytu veľmi malému mechanickému namáhaniu v porovnaní s inými metódami. Po druhé, tieto metódy sú lacné, vysoko klasifikovateľné a neznečisťujú vzorku. Okrem toho, techniky využívajúce magnetizmus sú prístupnejšie automatizácii a miniaturizácii [20].

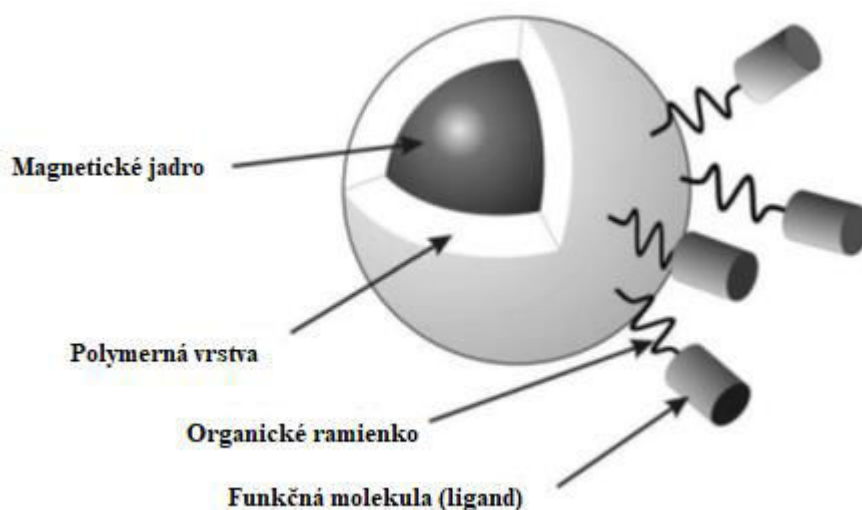
Techniky založené magnetických nosičoch našli uplatnenie v mnohých biologických oblastiach, napr. diagnostika, cielenie na liečivá, molekulárna biológia, izolácia buniek a purifikácia, rádioimunologický test, hypertermia spôsobujúce činidlá pre terapiu rakoviny, čistenie nukleových kyselín atď [21-23]. Hoci sa často označujú ako magnetické, mnohé v súčasnosti používané častice sú superparamagnetické, čo znamená, že tieto častice môžu byť ľahko magnetizované s vonkajším magnetickým poľom a redispergované ihneď po odstránení magnetu. Práve dostupný viaceré formáty častíc môžu byť triedené na[24]:

- zmagnetizovateľná zložka, ktorá zároveň pôsobí ako aj maticový materiál

- zmagnetizovateľná zložka, ktorá je rovnomerne rozptýlená cez objem materiálu matrice

- zmagnetizovateľná zložka, ktorá tvorí jadro častice a je potom zapuzdrená v maticovom materiáli - anorganické magnetické častice a anorganické / polymérne častice (pripravené v nano- alebo mikrometrovom meradle)

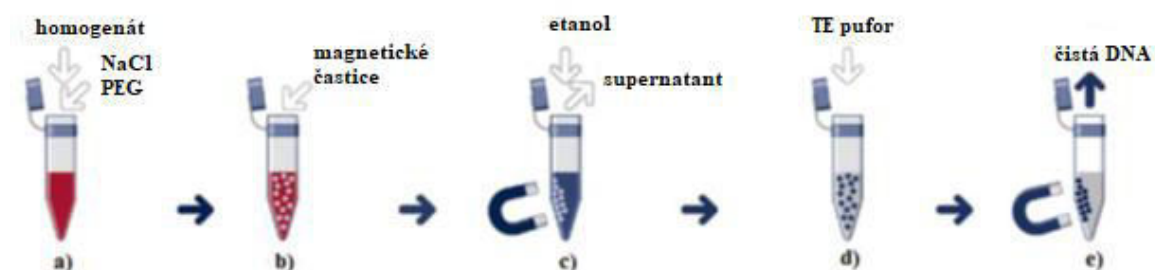
Tento tretí typ magnetických častíc bol použitý v tejto práci a môžete ho vidieť aj na obr. 1.



Obr. 1 Zobrazenie magnetickej častice s kovovým jadrom, ktoré je obalené matricou s ligandom (prevzaté a porobené z [25])

### 2.2.2 Izolácia DNA pomocou magnetických častíc

Izolácia DNA zo vzoriek za pomoci magnetických častíc je vždy založená na viac krokovom postupe. Najprv sa pripraví separačná zmes spolu s homogenátom buniek vzorky, kde sa DNA naviaže na častice. Následne sa táto zmes umiesti do separátora a premyje niekoľko krát etanolom alebo premivacím pufrom. V tejto fáze dochádza k odstráneniu prevažného množstva kontaminácie. DNA je následne eluovaná do pufru (napr. TE pufor) a uschovaná v chlade pre ďalšie použitie [26]. Schematické znázornenie postupu izolácie je uvedená na obr. 2.



Obr. 2 Schematické znázornenie postupu izolácie DNA s magnetickými časticami. (prevzaté a prerobene z [26])

### 2.3 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Kvalita a kvantita DNA izolovanej z tkanív rastlín, je veľmi dôležitá pre úspech ďalších reakcií ako sú napríklad PCR, sekvenovanie či klonovanie. Dva najbežnejšie spôsoby merania koncentrácie DNA je meranie absorbancie v oblasti UV alebo fluorescenčne za pomoci viazaného farbiva na DNA [27].

### **2.3.1 Stanovenie koncentrácie DNA – UV Spektrofotometricky**

Táto metóda merania je nedeštruktívna ale jej hlavný problém je že nemá dobre rozlíšenie a to hlavne medzi DNA a RNA. V tejto metóde sa pracuje hlavne v rozsahu vlnových dĺžok od 220 do 340 nm, kde okrem DNA a RNA interferujú aj proteíny, fenoly a rôzne ďalšie častice [27].

### **2.3.2 Stanovenie koncentrácie DNA – Fluorimetricky**

V tejto metóde sa využívajú špecifické väzby flouoroforu na DNA. Pre meranie sa používa vlnová dĺžka v závislosti na použitom fluorofore [28].

## **2.4 DNA barcoding**

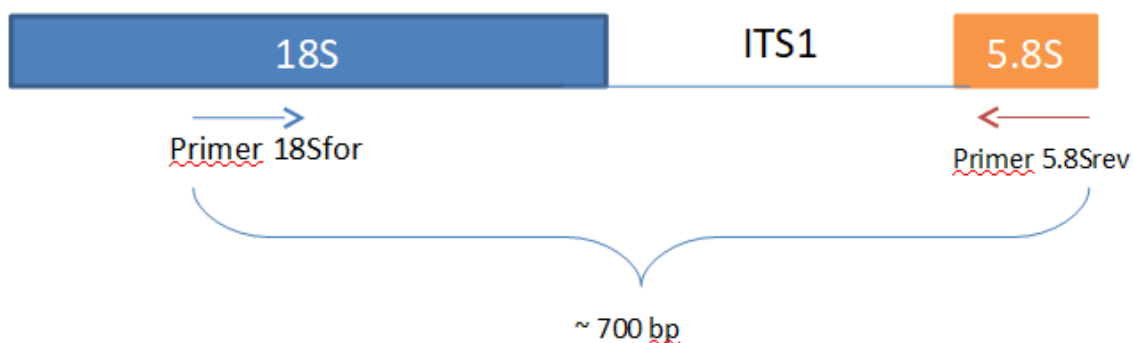
Niekoľko storočí sa vedci po celom svete snažia zaradiť jednotlivé organizmy do taxonomických skupín. Toto triedenie prebiehalo na základe skúmania morfológických znakov, čo nie je jednoduché a často krát je sprevádzané chybami. Dôvodom týchto chýb môžu byť rôzne obmedzenia tejto techniky. Tieto obmedzenia sú napríklad fenotypová plasticita a génová variabilita v znakoch, ktoré sa používajú na rozpoznávanie druhov. Ďalším je, že niektoré morfológické znaky sú typické pre určité štádia života jedinca či pre jeho pohlavie. Zároveň je nutné, aby túto prácu robili vysoko školení pracovníci, pre zníženie množstva chýb. Preto sa hľadalo riešenie ako by sa dalo ľahšie a efektívnejšie triediť organizmy do taxonomických skupín [29].

Z týchto dôvodov roku 2003 prišiel vedec Paul Herbert s kolegami na to, že by sa organizmy mohli triediť za pomoci skúmania špecifických malých úsekov DNA. Túto metódu nazval DNA barcoding (DNA čiarový kód). Vtedy sa hlavne sústredili na živočíšnu ríšu, ktorú skúmali za pomoci génu kódujúceho enzým pre cytochrom c oxidáza I [2]. Avšak pre rastliny sa musel nájsť iný gén či špecifické miesto v genóme, keďže gén pre cytochrom c oxidázu I nedosahoval veľkú špecifitu. Pre rastliny sa používajú tieto lokusy matK, rbcL, trnH-psbA a ITS. Následne sa táto metóda preniesla aj mimo taxonómie a začala sa využívať v iných vedných odboroch, napr. aj pre stanovenie autenticity potravín [30].

### **2.4.1 ITS oblasť**

V eukaryotoch, rDNA kóduje štyri typy ribozomálnych RNA (rRNA), t. j. 18S, 5,8S, 26S a 5S rRNA. Gény 18S, 5,8S a 26S (označované aj ako 35S rDNA v rastlinách) sú transkribované ako jeden operón a sú oddelené vnútornými transkribovanými oblasťami (ITS1 a ITS2) a intergénovými medzerníkmi (IGS). Napriek vysokému počtu kópií (stovky až tisíce jednotiek v rastlinách) sú gény takmer identické, čo sa vysvetľuje ich spoločným vývojom. V takomto evolučnom procese, ak je celá 35S rDNA jednotka rovnako ovplyvnená spoločným vývojom, potom očakávame malé alebo žiadne rozdiely v stupni intragenomickej homogenity medzi kódujúcimi sekvenciami. Následne aj, že nekódujúce oblasti (t. j. vnútorné transkribované oblasti (ITS1 a ITS2) a intergénové medzerníky (IGS)) podliehajú nižšiemu selekčnému tlaku ako kódujúce oblasti. Dostupné údaje ukazujú, že existuje značná intragenomová heterogenita v sekvenciách ITS. Práve táto nehomogenita podmienila vedcov pre jej využitie u DNA barcoding ako jeden z markerových lokusov [3].

Pre túto diplomovú prácu sme si preto vybrali ITS oblasť, presnejšie jej prvý úsek ITS1, s ktorou budeme sledovať tieto štyri rastlinné druhy: brokolica, repa červená, mrkva a paprika. Schematické znázornenie oblasti ITS1 na časti v DNA s vyznačenými miestami pre naviazanie primerov je uvedené na obr. 3.



Obr. 3 Schematické zobrazenie oblasti ITS1 a časti génov pre 18S a 5,8S na ktorých sú vyznačené miesta naviazania primerov pre PCR (Dr. Kovařík)

## 2.5 PCR

Teoretický proces amplifikácie DNA s DNA polymerázou *E. coli* načrtol Keppe so svojimi spolupracovníkmi v roku 1971. Experimentálna aplikácia a vylepšovanie tejto techniky postupovalo až po zavedení tepelne stabilnej DNA polymerázy z baktérie *Thermus aquaticus* (známa ako *Taq* DNA polymeráza). Kary Mullis za tento výskum získal aj Nobelovu cenu za chémiu. Základné zložky pre PCR sú termocyklér, templát DNA, primery, reakčný pufor, voľné nukleotidy, polymeráza, soli a voda (vo vysokej čistote) [32]. Celý proces prebieha v troch cykloch: denaturácia, hybridizácia a elongácia. Jednotlivé zložky PCR a cykly budú opísané v ďalších kapitolách.

### 2.5.1 Základné zložky PCR

Pre pochopenie procesu treba najprv zvážiť aké komponenty sa pridávajú do PCR skúmavky:

- Reakčný pufor – obsahuje  $Mg^{2+}$  iony s presne upravenou pH vhodnou pre danú DNA polymerázu.
- dNTP – jednotlivé nukleotidy, ktoré sú základnou stavebnou časticou pre dotvorenie druhého reťazca DNA.
- Termostabilná DNA polymeráza – enzým využívaný pre namnoženie amplikónu.
- Primery- krátke oligonukleotidy, ktoré sa viažu na jednovláknovú DNA v DNA tepláte.
- DNA templát – DNA získaná zo vzorky, ktorú chceme skúmať pomocou PCR.
- PCR voda – tridestilovaná voda, pre doplnenie zvyšného objemu v PCR.



## 2.5.2 Cykly PCR

### 2.5.2.1 Denaturácia

V tejto fáze sa od seba oddeľujú dvojité vlákna špirály DNA. Toto delenie je spôsobené vysokou teplotou (tzv. teplota tavenia alebo denaturačná teplota). Denaturačná teplota rozbíja vodíkové väzby medzi jednotlivými pármami v DNA závitnici. Hranica tejto teploty je 90 až 94 °C. Takto uvoľnené jednovláknové DNA reťazce sa môžu stať templátom pre PCR.

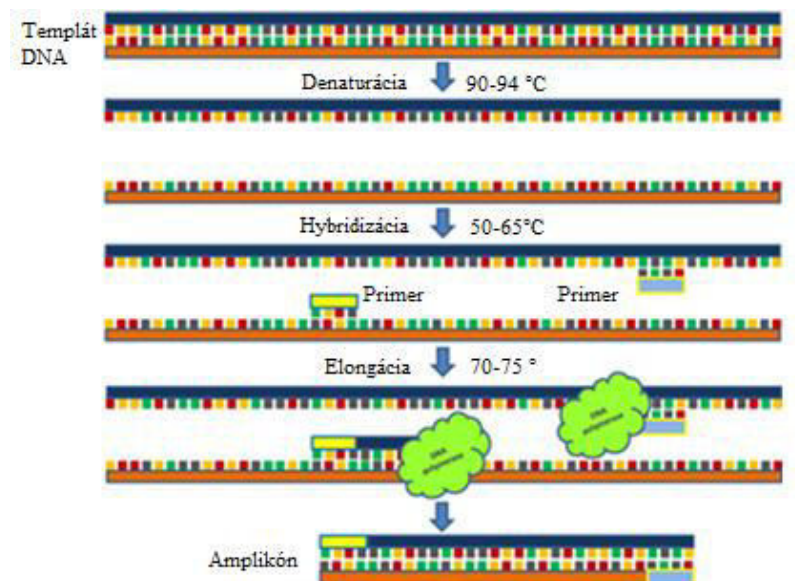
### 2.5.2.2 Hybridizácia

Po denaturácii sa teplota zníži na 50 – 65 °C, a to na akú presnú teplotu závisí od DNA primerov, ktoré sa potom viažu na jednovláknovú DNA. Tieto primery sa obvykle používajú v pároch a to preto aby bolo pre každé vlákno jeden. Miesta naviazania primerov slúžia ako východiskové miesto pre DNA polymerizáciu (tzn. počiatok kopírovania DNA). Dĺžka týchto primerov väčšinou býva od 15 do 30 bp.

### 2.5.2.3 Elongácia

Po naviazaní primerov, sa teplota zvýši na 70-75 °C. Po zvýšení teploty začne DNA polymeráza syntézu nového vlákna DNA. DNA polymeráza pridáva podľa templátu jednotlivé nukleotidy pre správne vytvorenie špirály DNA.

Tieto cykly sa opakujú 25 až 35krát podľa počiatočnej koncentrácie DNA templátu a potrebnej konečnej koncentrácie amplikónu (produktu PCR) [32]. Na obr. 4 zároveň môžeme vidieť priebeh jedného cyklu PCR



Obr. 4 Zobrazenie priebehu jedného cyklu PCR (prevzaté a upravené z [33])

## 2.6 Restriktčné enzýmy

Overenie špecificity amplikónov je možné spraviť štiepením reštrikčnými enzýmami. Reštrikčné enzýmy sú enzýmy, ktoré rozpoznávajú špecifické sekvencie DNA a následne DNA štiepia. Podstatou je aby toto miesto štiepenia obsahovalo nechránenú cieľovú sekvenciu DNA. Pokiaľ je cieľové miesto chránené metyláciou adenosínových alebo cytozínových zvyškov, zabráňujú štiepeniu DNA. Reštrikčné enzýmy boli klasifikované ako systémy typu I, II a III.



Do týchto troch skupín sú roztriedené podľa zloženia podjednotiek, požiadavkách na kofaktor a typu enzymatickej reakcie, ktorú katalyzujú. Väčšina doteraz známych a využívaných reštrikčných enzýmov sú typu II. Sú základom rekombinantnej technológie DNA pretože štiepia DNA presne v mieste alebo blízko cieľovej sekvencie, ktoré majú rozpoznať a štiepiť. Okrem toho reštrikčné enzýmy typu II majú veľmi jednoduché reakčné podmienky: nevyžadujú žiadny iný kofaktor než  $Mg^{2+}$  na štiepenie DNA.

Okrem enzýmov typu II boli popísané aj typy I a III. Enzýmy typu III sú niečo zložitejšie v tom, že reštrikčný enzým je zložený z dvoch rôznych podjednotiek, vyžaduje ATP a  $Mg^{2+}$  na štiepenie DNA a v prítomnosti S-adenozyl metionínu (AdoMet), môže tiež pôsobiť ako metyláza. Typ I skladajú z 3 rôznych podjednotiek, vyžadujú  $Mg^{2+}$ , ATP a AdoMet na štiepenie DNA a vykazujú vysokú ATPázovú aktivitu po inkubácii s nemodifikovanou DNA. Proces vedúci k štiepeniu DNA reštrikčnými enzýmami typu I na zdanlivo náhodné miesta až niekoľko tisíc párov báz vzdialené od ich rozpoznávacej sekvencie. Všetky genetické lokusy kódujúce systémy typu I sú identifikované do dvoch transkripčných jednotiek. Prvá obsahuje gény *hsdM* a *hsdS* a druhá obsahuje len *hsdR* [34].

## 2.7 Gélová elektroforéza DNA

Elektroforéza na agarózovom géle je najúčinnnejším spôsobom separácie fragmentov DNA rôznych veľkostí v rozsahu od 100 bp do 25 kb. Agaróza sa izoluje z morských rias rodu *Gelidium* a *Gracilaria* a pozostáva podjednotiek agarobiózy (L- a D-galaktosy), ktoré sa opakujú. Počas vzniku gélu sa agarózové polyméry spájajú nekovalentne a tvoria sieť zväzkov, ktoré určujú veľkosti pórov. V elektroforéze na agarózovom géle sa DNA vloží do vopred pripravených jamiek v géle a aplikuje sa prúd. Fosfátová kostra molekuly DNA (i RNA) je záporne nabitá, takže keď sa umiestni do elektrického poľa, fragmenty DNA budú migrovať k pozitívne nabitej anóde. Keďže DNA má jednotný pomer hmotnosti a náboja, tak sa molekuly DNA delia na základe veľkosti v agarózovom géle. Zároveň prejdená vzdialenosť je nepriamo úmerná logaritmu jeho molekulovej hmotnosti. Rýchlosť migrácie molekuly DNA cez gél je určená nasledujúcimi podmienkami: veľkosťou molekuly DNA, koncentráciou agarózy, konformáciou DNA, veľkosťou aplikovaného napätia/prúdu, prítomnosťou etídiumbromidu (alebo iného farbiva), typom agarózy a použitým elektroforéznym pufrom. Po separácii, sa môžu molekuly DNA vizualizovať pod UV svetlom po farbení vhodným farbivom, ak sa už nepridal do gélu [35].

### **3. CIELE PRÁCE**

1. Izolácia DNA zo zeleniny (brokolica, repa červená, paprika, mrkva obecná) metódou s využitím magnetických častíc a CTAB metódou.
2. Amplifikácia DNA v PCR.
3. Vyhľadávanie cieľových miest pre reštrikčné enzýmy (in silico analýza).
4. Analýza produktov PCR štiepením reštrikčnými enzýmami.

## 4. EXPERIMENÁLNA ČASŤ

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Vzorky

Tab. 5 Prehľad využitých vzoriek

Zelenina	Latinský názov	Použitá časť	Z kadiaľ získaná
Brokolica	<i>Brassica oleracea</i>	Kvetnice (ružice)	Z obchodného reťazca Brněnka
Repa červená	<i>Beta vulgaris</i>	Koreň	Z obchodného reťazca Brněnka
Mrkva obecná	<i>Daucus carota</i>	Koreň	Z obchodného reťazca Brněnka
Paprika siata	<i>Capsicum annum</i>	Plod a semiačka	Z obchodného reťazca Brněnka

#### 4.1.2 Chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu DNA (Top-Bio, Praha, ČR)
- Cetyl trietylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Etidium bromid (10 mg/mL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fluorescenčné farbivo Midori green (Ecoli, Bratislava, SR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chloroform-oktanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Isopropylalkohol (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- Octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- $\beta$ -merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Polyetylenglykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymetyl-aminometan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)
- F kol B100 ot (Kanada) – magnetické guľičky – konc. 2mg/ml

Všetky chemikálie boli v čistote p.a.

#### 4.1.3 Komponenty pre PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR reakčný pufr kompletný pre LA DNA polymerázu (5 U/ $\mu$ L) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Nanášací pufr Yellow load (6xkoncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)

- DMSO (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR) (PCR enhancer)
- DNA štandard (100 bp rebríček), obsahuje fragmenty DNA o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Zmes dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery : 18S\_for a 5,8S\_rev (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- LA DNA polymeráza (5 U/μL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- EliZyme FAST *Taq* polymeráza (5 U/μL) (ELISABETH PHARMACON, Brno, ČR)

#### 4.1.4 Enzýmy použité pre reštrikčnú analýzu

- *EcoRV* (20 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *Sau3A1* (4 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *MseI* (10 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *HaeIII* (10 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *SphI* (10 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *RsaI* (10 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *TaqI* (20 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)
- *Tsp45I* (5 000 U/ml) (New England Biolabs, USA)

#### 4.1.5 Prístroje

- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Eppendorfove skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Nórsko)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117 (SENCOR, ČR)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- PCR box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Pipety automatické 1 000 μl, 200 μl, 20 μl, 10 μl
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermo shaker TS-100C (Biosan, Riga, LV)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Quantus Fluorometer E6150 (Promega, USA)

## 4.2 Metódy

### 4.2.1 Izolácia DNA použitím magnetických častíc

#### 4.2.1.1 Homogenizácia častí rastlín plastovým kopistom a následná príprava lyzátov buniek pre izoláciu DNA.

Sterilne sa odvážilo 0,1 g vzorky, ktoré sa nakrájalo na malé kúsky a premiestnilo sa do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek. Potom sa pridalo do skúmaviek 500  $\mu$ l lyzačného roztoku s CTAB zložkou a 1  $\mu$ l merkaptoetanolu (0,2%). Následne boli Eppendorfové skúmavky premiestnené do predom vymrazenej kovovej kocky, kde sa robila homogenizácia plastovým kopistom. Takto zhomogenizované vzorky boli inkubované pri 60 °C po dobu 30 minút. Po inkubácii sa pridalo 500  $\mu$ l chloroform-oktanolu a vzorky boli premiešavané kývavým pohybom po dobu 4–5 minút. Vzorky sa potom zcentrifugovali (14 500 otáčkach/10 min) a supernatant (horná fáza) bola odpipetovaná do čistej Eppendorfovej skúmavky. Homogenáty boli použité pre izoláciu DNA.

#### 4.2.1.2 Izolácia DNA z homogenátu za pomoci magnetických častíc

Pripravila sa separačná zmes (Tab. 6.) a nechala sa inkubovať pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút. Následne sa eppendorfové skúmavky premiestnili do magnetického separátora, kde prebiehala separácia po dobu 5 minút. Po tomto čase sa supernatant odpipetoval. Potom boli magnetické častice s DNA premyté 500  $\mu$ l 70% etanolu a separácia v separátore trvala 1 minútu. Po odpipetovaní supernatantu sa pridalo 100  $\mu$ l 70% etanolu, čím sa spláchli častice pripevnené na stene skúmavky a separácia v magnetickom separátore znova trvala po dobu 1 minúty. Supernatant sa znova odpipetoval a Eppendorfové skúmavky boli prenesené do termostatu s teplotou 37 °C po dobu približne 5 minút, kde sa mali vysušiť od zvyšného etanolu. Po vysušení sa pridalo 50-100  $\mu$ l TE pufra a táto zmes sa nechala inkubovať hodinu pri laboratórnej teplote. Častice sa odseparovali a DNA zostala v eluáte.

Tab. 6 Komponenty pre izoláciu DNA z homogenátov vzoriek za pomoci magnetických častíc

Poradie	Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
1	5M NaCl	100
2	Homogenát	150
3	40 % PEG	200
4	mag. častice	50

### 4.2.2 Izolácia DNA metódou CTAB

Treba zozbierať okolo 1-5 g tkaniva. Homogenizácia tkaniva prebiehala rozdrvením v trecej miske s tekutým dusíkom. Rozdrený prášok je potom prenesený do 50 ml eppendorfovej skúmavky s 2-10 ml CTAB lyzačným pufrom. Lýza buniek pokračuje pri 60 °C počas 60 minút za občasného miešania.

Po lýze sa pridá rovnaké množstvo chloroform-oktanolu (24:1) zmesi, poriadne sa premieša na vortexe a centrifuguje na 10 000 x g, 10 minút a 25 °C. Odoberá sa vrchná fáza s DNA.

Prenesie sa horná fáza do čistej erlenmayerovej banky a precipituje s izopropanolom (0,6 množstva hornej fázy) o teplote 25 °C na 10 minút. DNA vlákna sa potom pozbierajú žltou špičkou (špička môže byť rozkrojená pre zväčšenie diery). Keď je už len malé množstvo DNA a vlákna už nie sú viditeľné, môže sa zvyšok precipitátu centrifugovať na centrifuge (10 000 x g, 5 minút, 25 °C). Precipitát je premytý s 10 mM octanom sodným, pH 7.4 v 70 % etanole (3 x 30 minút alebo počas noci), potom je nutné centrifugovať a vysušiť poriadne.

Potom sa rozpúšťa DNA zrazenina v 1-2 ml TE pufru (10 mM tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mM EDTA) v eppendorfovej skúmavke. Množstvo pufru je rôzne a závisí na vzorke. Inkubácia pri zvýšenej teplote (50 °C) urýchľuje rozpúšťanie. Treba sa uistiť, že sa DNA dobre rozpustila. Pridá sa 8 µl tepelne upravenej RNázy – A (10 mg/ml zásobného roztoku) a inkubuje sa pri 37 °C na 15 minút. Potom sa pridá 8 µl Proteázy – K (10 mg/ml zásobného roztoku) a nechá sa inkubovať na 50 °C na 2 hodiny.

K roztoku DNA sa pridá roztok fenol–chloroform–isoamylalkohol (25:24:1), vortexuje sa, odstredí v miktrocentrifuge na 2 minúty. Horná fáza sa preniesie do čerstvej skúmavky a pridá sa rovnaký objem chloroform–izoamylalkoholu (24:1). Vortexuje sa a vloží sa do miktrocentrifugi na 2 minúty. Horná fáza sa preniesie do čerstvej skúmavky, roztok sa okyslí pridaním 10 µl 3 M octanu sodného (pH 5,2) a DNA sa vyzráža studeným etanolom (-20 °C) o 2,5násobku objemu. Zmes sa dobre premieša a zrazenina DNA sa odstredí. Peleta sa preplácha 70 % etanolom, vysuší a rozpustí v 200 až 400 µl TE pufre.

### **4.3 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA spektrofotometricky**

Pre toto stanovenie sa používal Nanodrop 2000. Na šošovku Nanodropu sa napipetovalo 1 µl zo zmesi s DNA a spustilo sa meranie. Bola meraná absorbancia medzi vlnovými dĺžkami 220-340 nm. Program patriaci k tomuto zariadeniu ukáže celý priebeh absorbancie v sledovanom rozmedzí a aj tabuľku s hodnotami pre 260 a 280 nm, spolu so vzájomným pomerom a pomer 260 a 230 nm. Z týchto pomerov sa môžeme dozvedieť čím je naša vzorka DNA znečistená.

### **4.4 Stanovenie koncentrácie DNA fluorometrom**

Extrahovaná DNA z rastlín sa kvantifikovala použitím Quantus fluorometra (od firmy Promega). Použil sa QuantiFluor® dsDNA (dvojvláknová DNA) system podľa inštrukcií z užívateľskej príručky. QuantiFluor® dsDNA system obsahuje fluorescenčné farbivo viažuce DNA, ktoré umožňuje citlivú a špecifickú kvantifikáciu malých množstiev dsDNA. Postup prebiehal v dvoch krokoch, kde sa najprv pripravila kalibrácia prístroja a následne prebehlo meranie vzoriek DNA.

#### **4.4.1 Kalibrácia Quantus fluorometra**

Pre kalibráciu zariadenia je potrebné pripraviť dva roztoky a to blank a štandardný roztok. Ako blank roztok sa použil pracovný roztok QuantiFluor® dsDNA, z ktorého sa odpipetovalo 200 µl do prázdnej 0,5 ml PCR skúmavky. Štandardný roztok bol pripravený pridaním a 1 µl dodaného DNA štandardu k 200 µl pracovného roztoku QuantiFluor® dsDNA pridalo 100 µl a zmiešalo sa. Následne sme nechali štandard 5 minút inkubovať v tme. Fluorometer Quantus bol potom kalibrovaný odčítaním slepej a štandardnej vzorky. Nastavenia sa uložili do prístroja.

#### 4.4.2 Meranie vzoriek zeleniny

Objem 1  $\mu\text{l}$  vzorky sa zriedil v 200  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku farbiva QuantiFluor® dsDNA v 0,5 ml PCR skúmavky. Zmiešaný roztok bol inkubovaný pri teplote miestnosti počas 5 minút, chránený pred svetlom. Fluorimeter Quantus bol nastavený na dsDNA protokol a nastavil sa objem vzorky 1  $\mu\text{l}$  a požadované jednotky koncentrácie. Potom sa namerala koncentrácia našich vzoriek.

#### 4.5 Príprava PCR zmesi a PCR

Na začiatku sa získaná DNA zo vzorky zriedila 10x a potom sa pripravil spoločný master mix pre všetky vzorky s nariadenou DNA a kontroly na PCR (tab. 7). Pre tvorbu master mixu boli použité PCR komponenty vynásobené počtom vzoriek, spolu s kontrolami (tab. 8). Pripravený master mix sa rozpipetoval do malých Eppendorfových skúmaviek po 23  $\mu\text{l}$ . Do každej skúmavky sa pridala sledovaná vzorka DNA po 2  $\mu\text{l}$  a skúmavky sa vložili do termocyklera. Na termocykleru sa navolil program ROST700, ktorý bol nastavený pre detekciu nášho výsledného produktu 700 bp. Toto nastavenie sa nachádza v tab. 9.

Tab. 7 Označenie používaných vzoriek

Značení	
N	neriedený vzorka DNA
Ř	riedený vzorka DNA
PK	pozitívna kontrola – <i>N. tabacum</i> (R 50x; c=10ng/ $\mu\text{l}$ )
NK	negatívna kontrola
Č	kontrola častíc – bola pridaná voda namiesto homogenátu pred separáciou na separátore

Tab. 8 Príprava zmesi master mix pre PCR

PCR Komponenty	V [ $\mu\text{l}$ ]
voda pre PCR	18,5
kompletný reakčný pufor	2,5
primer 18S for (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5
primer 5,8S rev (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5
zmes dNTP (10 mM)	0,5
Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5
matrice DNA	2,0
<b>celkový objem</b>	<b>25,0</b>

Tab. 9 Použitý program pro PCR s názvom ROST700

Predĺžená denaturácia DNA	Denaturácia DNA	Hybridizácia primerov	Syntéza nových reťazcov DNA	Dosyntetizovanie DNA
95 °C/5 min	95 °C/40 s	57 °C/40 s	72 °C/80 s	72 °C/10 min
	35 cyklov			

#### 4.6 Gélová elektroforéza pre detekciu produktov PCR (amplikónov) a ich reštrikčných fragmentov

Pripravil sa 1,2% gél, to znamená, že sa pridalo 0,9 g agarózy na 75 ml 0,5 x TE pufru. Potom sa táto suspenzia rozvarila v mikrovlnnej trúbe do úplného rozpustenia agarózy. Po ochladení, bol do suspenzie pridané 1 µl farbiva Midori Green. Po premiešaní sa táto zmes naliala do elektroforetickej vaničky s hrebeňom. Po stuhnutí gélu sa hrebeň vybral. Na gél bolo nanášané celkové množstvo zmesi 25 µl a to zo 25 µl vzorky a 5 µl nanášacieho pufru. Na kraj gélu sa do komôrky pridalo 5 µl DNA štandardu 100 bp (rebríček). Vanička s gélom bola potom vložená do elektroforetického zariadenia, kde sa zaliala 0,5 x TE pufrom až po označenie na zariadení. Následne bola spravená elektroforéza pri 80 V/2 hodiny. Po uplynutí času sa gél vyhodnotil pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 305 \text{ nm}$  a zdokumentoval fotograficky.

Rovnaký postup je aj pri tvorbe 1% agarózového gélu avšak do 75 ml 0,5 x TE pufru sa pridá 0,75 g agarózy.

#### 4.7 Štiepenie DNA za pomoci reštrikčných endonukleáz

5 µl PCR produktu (asi 700 bp) sa prepipetovalo do čistej eppendorfovej skúmavky, kde sa pridalo 1 µl reštrikčného enzýmu a 14 µl pufru patriaceho k danému enzýmu. Následne sme štiepli 2 hodiny pri optimálnej teplote enzýmu. Po tomto štiepení sa produkty štiepenia nanesú na 1% gél s agarózou. Ďalej gélová elektroforéza prebiehala rovnako ako v kap. 4.6.

#### 4.8 Bioinformatická analýza

Pre bioinformatickú analýzu hľadaného úseku DNA (asi 700 bp produkt PCR), sa najprv vyhládala stránka NCBI a jej podzložka Nucleotide. Do vyhľadávača sa zadali latinský názov vzorky a za tým tento kľúčový výraz: „18S ITS1 5,8S“. Po nájdení vhodného výsledku z vyhľadávania sa skopírovalo prístupové číslo (accession number), ktoré potom zadáme do programu BioEdit. Tento program nám vyhladá daný úsek DNA vo fasta formáte a pridá ho do aktívneho okna pre ďalšie spracovanie. Tento úsek sa porovná s namodelovanými primermi ktoré ohraničia oblasť hľadaného úseku asi 700 bp. Potom tento úsek bol zadaný do online programu NEBcutter, kde sa hľadali vhodné reštrikčné enzýmy a ich štiepne miesta. Výsledky tejto analýzy sa potom porovnávali s reálnymi štiepeniami.



## 5. VÝSLEDKY

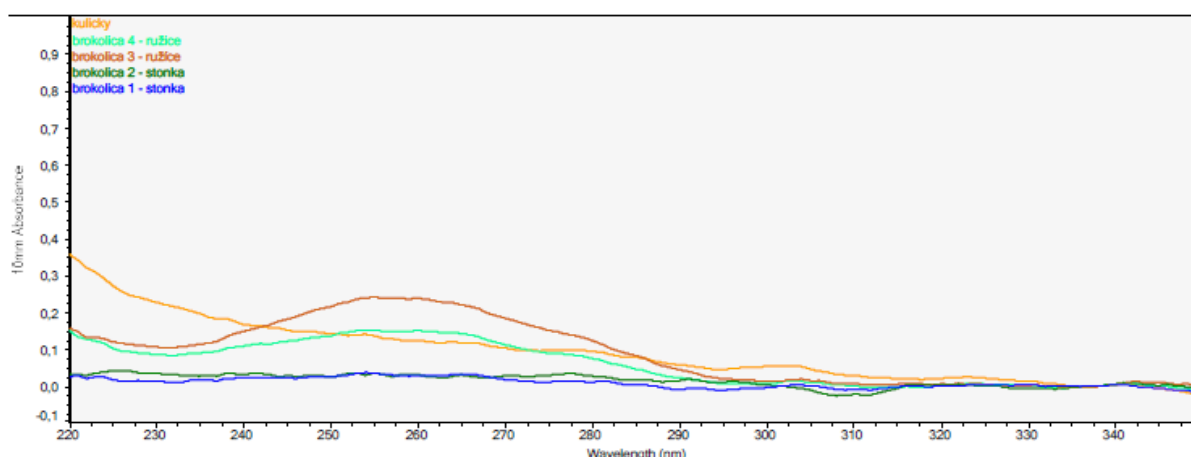
### 5.1 Izolovanie DNA brokolice (*Brassica oleracea*) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR

#### 5.1.1 Izolácia DNA z brokolice

Homogenizácia a izolovanie DNA z brokolice prebiehalo presne podľa metódy 4.2.1. Odoberali sa dve vzorky pre stonku brokolice a dve pre kvetnice (ružice) brokolice. Výsledky spektrofotometrie DNA po separácii na magnetických guľičkách môžeme vidieť v tab. 10 a v grafe 1.

Tab. 10 Hodnoty spektrofotometrickej analýzy DNA pre brokolicu

	DNA	Koncentrácia DNA [ $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ]	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>230nm</sub>
1	brokolica 1 - stonka	1,2	0,024	0,006	4,31	2,72
2	brokolica 2 - stonka	1,4	0,027	0,023	1,20	0,92
3	brokolica 3 - ružice	11,7	0,234	0,119	1,97	2,29
4	brokolica 4 - ružice	7,3	0,146	0,070	2,08	1,80

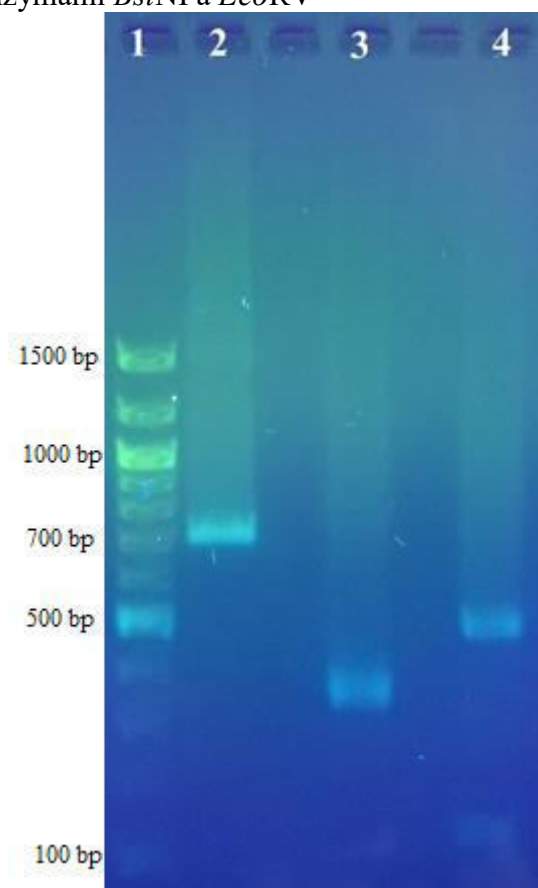


Graf 1 Grafické zobrazenie závislosti hodnôt absorbie na vlnovej dĺžke pre DNA z brokolice

#### 5.1.2 PCR a detekcia produktov DNA

Následne sa vzorky DNA z brokolice spojili a použili pre PCR. Zmesi pre PCR boli pripravené podľa tab. 8 a amplifikácia prebiehala podľa 4.5. Produkty PCR boli detegované pomocou gélovej elektroforézy na agaróze (obr. 5 beh č.2).

Obr. 5 Gelová elektroforéza PCR produktov brokolice a reštrikčných fragmentov po štiepení s enzýmami *Bst*NI a *Eco*RV



Číslo behu	DNA	Enzým	Detekcia		Približné veľkosti reštrikčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard, 100 bp rebrík				
2	Brokolica	.	+	-	700
3	Brokolica	<i>Bst</i> NI	+	+	350
4	Brokolica	<i>Eco</i> RV	+	+	485 a 120

+ : detekcia produktov PCR a štiepenia

- : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

### 5.1.3 Reštrikčná analýza

PCR produkty sa podrobili reštrikčnej analýze podľa metódy 4.7. Pre štiepenie sa použili reštrikčné enzýmy *Eco*RV a *Bst*NI. Výsledky štiepení sú uvedené na obr. 5 behy č. 3 a 4.

### 5.1.4 Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) brokolice

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom KX709351. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta pro reštriktázy *Eco*RV a *Bst*NI.

			10	20	30	40	50
<i>Brassica oleracea</i>	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	g				
	50		g				
			60	70	80	90	100
<i>Brassica oleracea</i>	51	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	g				
	100		g				
			110	120	130	140	150
<i>Brassica oleracea</i>	101	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	t				
	150		t				
			160	170	180	190	200
<i>Brassica oleracea</i>	151	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	a				
	200		a				
			210	220	230	240	250
<i>Brassica oleracea</i>	201	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	t				
	250		t				
			260	270	280	290	300
<i>Brassica oleracea</i>	251	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	c				
	300		c				
			310	320	330	340	350
<i>Brassica oleracea</i>	301	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	a				
	350		a				
			360	370	380	390	400
<i>Brassica oleracea</i>	351	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	a				
	400		a				
			410	420	430	440	450
<i>Brassica oleracea</i>	401	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	c				
	450		c				
			460	470	480	490	500
<i>Brassica oleracea</i>	451	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	c				
	500		c				
			510	520	530	540	550
<i>Brassica oleracea</i>	501	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	g				
	550		g				

```

                    560      570      580      590      600
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Brassica oleracea 551 cccggagacgggtgtttgttcggaagcagtgctgcaatgtaaagtctaaaa
600

                    610      620      630      640      650
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Brassica oleracea 601 cgactctcggcaacggatatctcggctctcgcacgatgaagaacgtagc
650

                    660      670      680      690      700
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Brassica oleracea 651 gaaatgcgatacttgggtgtgaattgcagaatcccgtagaaccatcgagtc
700

                    710
                    ....|....|....|.
Brassica oleracea 701 ttgaacgcaagttggc 716

```

Miesta pripojenia primerov:

**gegetacaetgatgtattcaacgag** – 18S\_for

**tcgagtccttgaacgcaagttggc** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

*Bst*NI – **cctgg** – 369 a 347 bp

*Eco*RV – **gatatc** – 487, 131 a 98 bp

Z brokolice bola magnetickými časticami izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR (asi 700bp) bol štiepený reštriktázami *Eco*RV na fragmenty o približnej dĺžke 485 a 120 bp, *Bst*NI na fragment o dĺžke asi 350 bp. Experimentálne výsledky sú približne v zhode s bioinformatickou analýzou.

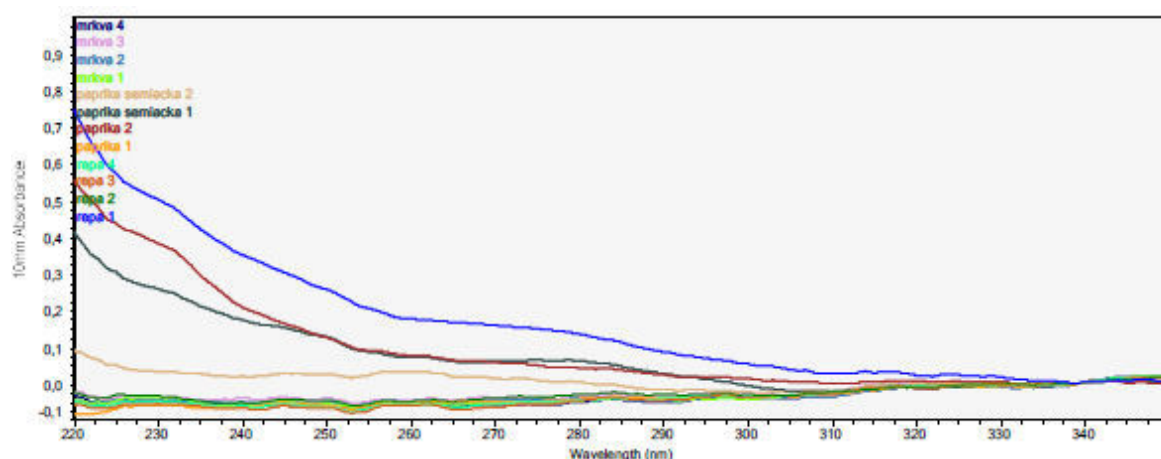
## 5.2 Izolovanie DNA repy červenej (*Beta vulgaris*) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR

### 5.2.1 Izolácia DNA z repy červenej

Homogenizácia a izolovanie DNA z repy prebiehalo presne podľa metódy 4.2.1. Odoberali sa vzorky z koreňu repy červenej. Výsledky spektrofotometrie DNA po separácii na magnetických guľičkách môžeme vidieť v tab. 11 a v grafe 2.

Tab. 11 Hodnoty spektrofotometrickej analýzy DNA pre repu červenú

	DNA	Koncentrácia DNA [ng $\mu\text{L}^{-1}$ ]	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> / A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> / A <sub>230nm</sub>
1	repa 1	8,7	0,173	0,132	1,32	0,35

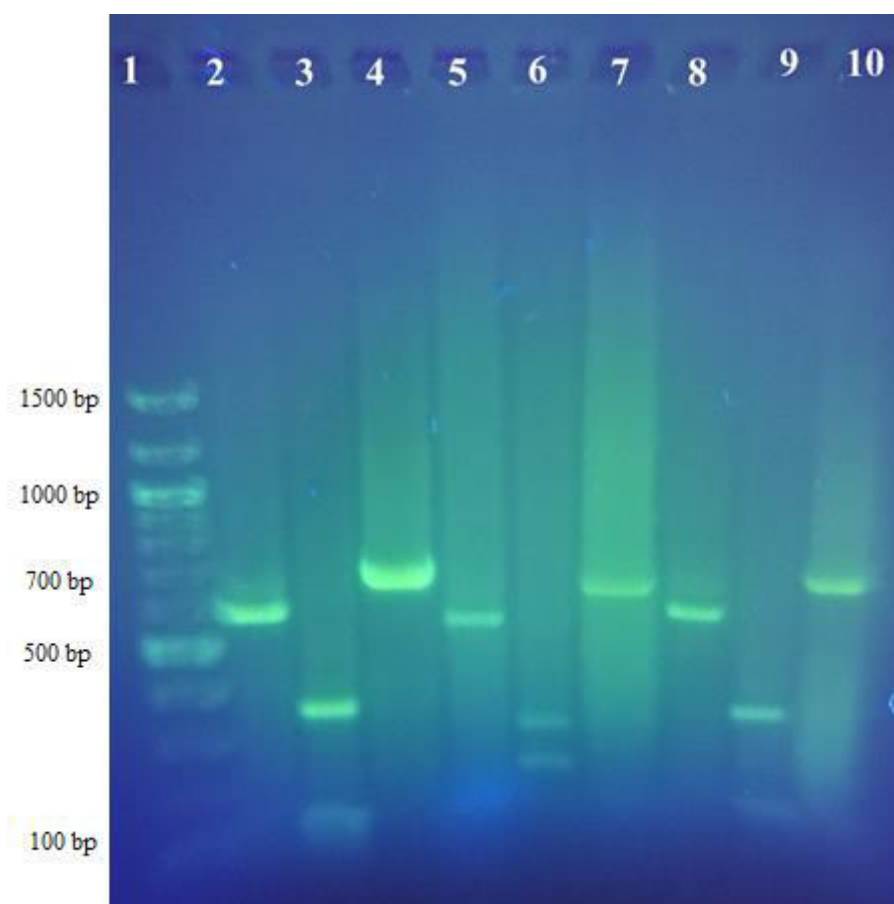


Graf 2 Grafické zobrazenie závislosti hodnôt absorbancií na vlnovej dĺžke pre DNA z repy, papriky a mrkvy

### 5.2.2 PCR a detekcia produktov PCR

Následne sa jednotlivé vzorky DNA použili pre PCR. Zmesi pre PCR boli pripravené podľa tab. 8 a amplifikácia prebiehala podľa 4.5. Produkty PCR boli detegované pomocou gélovej elektroforézy na agaróze (obr. 6 beh č.4).

Obr. 6 Gélová elektroforéza PCR produktov červenej repy, papriky a mrkvy a reštrikčných fragmentov po štiepení s enzýmami *EcoRV* a *Sau3AI*



Číslo behu	DNA	Enzým	Detekcia		Približné veľkosti reštrikčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard, rebrík 100bp				
2	Repa	<i>EcoRV</i>	+	+	580
3	Repa	<i>Sau3AI</i>	+	+	370 a 150
4	Repa		+	-	700
5	Mrkva	<i>EcoRV</i>	+	+	570
6	Mrkva	<i>Sau3AI</i>	+	+	340 a 270
7	Mrkva		+	-	700
8	Paprika	<i>EcoRV</i>	+	+	580
9	Paprika	<i>Sau3AI</i>	+	+	360 a 175
10	Paprika		+	-	700

+ : detekcia produktov PCR a štiepenia

- : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

### 5.2.3 Reštrikčná analýza

PCR produkty sa podrobili reštrikčnej analýze podľa metódy 4.7. Pre štiepenie sa použili reštrikčné enzýmy *EcoRV* a *Sau3AI*. Výsledky štiepení sú uvedené na obr. 6 behy č. 2 a 3.

### 5.2.4 Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) repy červenej

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom HE577334. Vyznačené sú miesta pripojenie primerov a cieľová miesta pre reštriktázy *EcoRV* a *Sau3AI*.

```

          10      20      30      40      50
Beta vulgaris 1  GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCCTTGGCCGACAGGCCCG 50

          60      70      80      90     100
Beta vulgaris 51 GGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG 100

          110     120     130     140     150
Beta vulgaris 101 GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC 150

          160     170     180     190     200
Beta vulgaris 151 TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG 200

          210     220     230     240     250
Beta vulgaris 201 ATCCGGTGAAATGTTTCGGATCGGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCG 250

          260     270     280     290     300
Beta vulgaris 251 ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG 300

```

```

          310      320      330      340      350
Beta vulgaris 301  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          TAACAAGGTTTCCGTTAGGTGAACCTGCGGAAGGGATCATTGTTCGAATCTG 350

          360      370      380      390      400
Beta vulgaris 351  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          CAAAGCAGAGCAACCAGCGAACATGTTTTACATCTGTGGGACGGGGGTGC 400

          410      420      430      440      450
Beta vulgaris 401  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          TGGCGCGATGCTTTGGGTTGTGCCAGCCCCCTCCCCCATGTGCGGGGGCAC 450

          460      470      480      490      500
Beta vulgaris 451  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          TCCTACTTGGTTTGCTCCCCGGCGAAAAAACAACCCACGGCGCTTACTG 500

          510      520      530      540      550
Beta vulgaris 501  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          CGCCAAGGAACATGAAAAGGAGTGTGCCTGTCTTATGCATCGGTTTGCCG 550

          560      570      580      590      600
Beta vulgaris 551  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          GTGCGGGGATGTGGCACCCAGTATTAAGAGATAAAACGACTCTCGGCAAC 600

          610      620      630      640      650
Beta vulgaris 601  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          GGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTT 650

          660      670      680      690      700
Beta vulgaris 651  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          GGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCAATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTG 700

Beta vulgaris 701  .. 702

```

Miesta pripojenia primerov:

**GCGCTACACTGATGTATTCAACGAG** – 18S\_for

**TCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov

*Sau3AI* – **GATC** – 18, 83, 116, 116 a 369 bp

*EcoRV* – **GATATC** – 98 a 604 bp

Z repy bola magnetickými časticami izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR (asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami *EcoRV* na fragment o približnej dĺžke 580 bp, *Sau3AI* na fragmenty o dĺžke 370 a 150 bp. Experimentálne výsledky boli v približnej zhode s bioinformatickou analýzou. Krátke (<150 bp) fragmenty po *Sau3AI* štiepení sa nepodarilo rozlíšiť v dôsledku nízkej intenzity fluorescence v tejto oblasti.

### 5.3 Izolovanie DNA mrkvy obecnej (*Daucus carota*) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR

#### 5.3.1 Izolácia DNA z mrkvy obecnej

Homogenizácia a izolovanie DNA z mrkvy prebiehalo presne podľa metódy 4.2.1. Odobrali sa vzorky z koreňu mrkvy. Výsledky spektrofotometrie DNA po separácii na magnetických guľičkách môžeme vidieť v tab. 12 a v grafe 2.

Tab. 12 Hodnoty spektrofotometrickej analýzy DNA pre mrkvu obecnú

	DNA	Koncentrácia DNA [ng $\mu\text{L}^{-1}$ ]	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>230nm</sub>
1	mrkva 1	2,9	0,058	0,050	1,15	1,35
2	mrkva 2	2,6	0,053	0,044	1,20	1,10
3	mrkva 3	2,5	0,050	0,039	1,30	1,19
4	mrkva 4	3,0	0,059	0,055	1,08	1,25

#### 5.3.2 PCR a detekcia produktov PCR

Následne sa DNA z mrkvy použila pre PCR. Zmesi pre PCR boli pripravené podľa tab. 8 a amplifikácia prebiehala podľa 4.5. Produkty PCR boli detegované pomocou gélovej elektroforézy na agaróze (obr. 6, beh č.7).

#### 5.3.3 Reštrikčná analýza

PCR produkty sa podrobili reštrikčnej analýze podľa metódy 4.7. Pre štiepenie sa použili reštrikčné enzýmy *EcoRV* a *Sau3AI*. Jednotlivé fragmenty pre mrkvu môžeme uvidieť na obr. 6, behy č. 5 a 6.

#### 5.3.4 Bioinformatická analýza ampikónu (sekvencie rDNA) mrkvy obecnej

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom AY552527 a pre 18S kódujúcu oblasť ze sekvencie rajčiny X51576. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta pre reštriktázy *EcoRV* a *Sau3AI*.

```

10          20          30          40          50
Daucus_carota 1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCG 50

                  60          70          80          90          100
Daucus_carota 51  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GGTAAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG 100

                  110         120         130         140         150
Daucus_carota 101 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GTCTTCAACGAGGAATTCCAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC 150

                  160         170         180         190         200
Daucus_carota 151 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG 200

```



```

                210      220      230      240      250
Daucus_carota 201  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                260      270      280      290      300
Daucus_carota 251  ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG 300
                310      320      330      340      350
Daucus_carota 301  TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGGGATCATTTGTCGAATCCT 350
                360      370      380      390      400
Daucus_carota 351  GTGATACCAGAATGACTTGTTAACATGTAACAACAACGGGCAAGCAACTG 400
                410      420      430      440      450
Daucus_carota 401  TGGGCCTTTGGTCCCCCTGCTGTGAACCCAGGCAGGTGTCACCTTATGG 450
                460      470      480      490      500
Daucus_carota 451  TTCCCCTCGCCTAATAAAATCAACTGGGCGCTAGATGCGCCAAGGAAGTA 500
                510      520      530      540      550
Daucus_carota 501  AATAATGAATTGTTCTGTTCTCGTTCTCGCGGGGAGTGGCGGCGGTCC 550
                560      570      580      590      600
Daucus_carota 551  AAAACACAAGCGGACGTGTGCTTCTCTTATAAATAAAATTAATCTCTCGGC 600
                610      620      630      640      650
Daucus_carota 601  AATGGATATCTTGGCTCTCGTATTGATGAAAAACATAGTGAATACAATA 650
                660      670      680      690      700
Daucus_carota 651  CTTGGTGTGAATTGCAGAATCTCGTGAACCAATTGACTCTTTGAACGCAAG 700
                ....|
Daucus_carota 701  TTGCG 705

```

Miesta pripojenia primerov:

**GGCCTACACTGATGTATTCAACGAG** – 18S\_for

**TCGAGTCTTIGAACGCAAGTTGCG** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov:

*Sau3AI* – **GATC** – 18, 83, 116, 116 a 372 bp

*EcoRV* – **GATATC** – 98 a 607 bp

Z mrkvy bola magnetickými časticami izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR asi 700bp bol štiepený reštriktázami *EcoRV* na fragment o približnej dĺžke 570

bp, *Sau3AI* na fragmenty o dĺžke 340 a 270 bp. Experimentálne výsledky boli v približnej zhode s bioinformatickou analýzou.

## 5.4 Izolovanie DNA papriky sietej (*Capsicum annuum*) metódou magnetických častíc. Amplifikácia v PCR a overenie špecificity produktov PCR.

### 5.4.1 Izolácia DNA z papriky

Homogenizácia a izolovanie DNA z papriky prebiehalo presne podľa metódy 4.2.1. Odobrali sa vzorky z plodu papriky. Výsledky spektrofotometrie DNA po separácii na magnetických guľičkách môžeme vidieť v Tab. 13 a v grafe 2.

Tab. 13 Hodnoty spektrofotometrickej analýzy DNA pre papriku

	DNA	Koncentrácia DNA [ng $\mu\text{L}^{-1}$ ]	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>230nm</sub>
1	paprika - dužina	3,6	0,072	0,039	1,83	0,19
2	paprika semiačka 1	3,5	0,070	0,058	1,21	0,27
3	paprika semiačka 2	1,4	0,027	0,000	-2180,04	0,95

### 5.4.2 PCR a detekcia produktov PCR

Následne sa DNA z papriky použila pre PCR. Zmesi pre PCR boli pripravené podľa tab. 8 a amplifikácia prebiehala podľa 4.5. Produkty PCR boli detegované pomocou gélovej elektroforézy na agaróze (obr. 6, beh č.10).

### 5.4.3 Reštrikčná analýza

PCR produkty sa podrobili reštrikčnej analýze podľa metódy 4.7 . Pre štiepenie sa použili reštrikčné enzýmy *EcoRV* a *Sau3AI*. Jednotlivé fragmenty pre PCR produkt z papriky môžeme uvidieť na obr. 6 behy č. 8 a 9.

### 5.4.4 Bioinformatická analýza PCR amplikónu (sekvencie rDNA) papriky sietej

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom JQ885438. Vyznačené sú miesta pre pripojenie pimerov a cieľové miesta pre reštriktázy *EcoRV* a *Sau3AI*.

```

          10      20      30      40      50
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Capsicum annuum 1  GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCG 50

          60      70      80      90      100
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Capsicum annuum 51 GGTAATCTTTGAAATTCATCGTGATGGGGATAGATCAATTGCAATTGTTG 100

          110     120     130     140     150
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Capsicum annuum 101 GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC 150

          160     170     180     190     200
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.

```

*Capsicum annuum* 151 TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG 200

210 220 230 240 250  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 201 ATCCGGTGAAATGTTCCGGATCGGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCG 250

260 270 280 290 300  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 251 ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG 300

310 320 330 340 350  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 301 TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTGCTGTAGGTGA 350

360 370 380 390 400  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 351 ACCTGCGGAAGGATCATTTGTCAAAAACCTGCATAGCAGAATGACCCACGA 400

410 420 430 440 450  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 401 ACGTGTTTAAACAACCTGGGGAGCCACGTTGGCAGAGTGCTTCAGCCCTCA 450

460 470 480 490 500  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 451 GCACGAGAACCTTCCCTCGTCCTCGGTGCATGCACCCAGTACGCGCGTCG 500

510 520 530 540 550  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 501 GGCGACTAATGAACCCCAACGCGAAAAGCACCAAGGAATACCTTAAATTGA 550

560 570 580 590 600  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 551 CAGCCTGCACCTCACTCTCCATTCTGGCCTGTATCAAGCGGACGTGTGC 600

610 620 630 640 650  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 601 TTCTCTTATAAATAAAAATTACTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGT 650

660 670 680 690 700  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 651 ATTGATGAAAAACATAGTGAAATACAATACCTTGGTGTGAATTGCAGAAATC 700

710 720 730  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annuum* 701 TCGTGAACCAATTGACTCTTTGAACGCAAGTTGCG 734

Miesta pripojenia primerov:

GGCTACACTGATGTATTCAACGAG – 18S\_for

TCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

*Sau3AI* – GATC – 18, 29, 83, 115, 116 a 373 bp

*EcoRV* – gatatc – 98 a 636 bp

Z papriky bola magnetickými časticami izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR ( asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami *EcoRV* na fragment o približnej dĺžke 580 bp, *Sau3AI* na fragmenty o dĺžke 360 a 160 bp. Experimentálne výsledky boli v približnej zhode s bioinformatickou analýzou.

## 5.5 Izolácia a stanovenie koncentrácie DNA brokolice, červenej repy, papriky a mrkvy (metóda s CTAB).

Izolácia bola spravená podľa 4.2.2. DNA bola izolovaná z 5 g rastlinného tkaniva. Pre stanovenie koncentrácie boli použité dve metódy a to spektrofotometria a fluorimetria. Postup u týchto metód je popísaný v 4.3 a 4.4. Všetky hodnoty sa potom zapísali do tab. 14.

Tab. 14 Hodnoty koncentrácií DNA izolovanej metódou CTAB

DNA	UV Spektrofotometria [ng/μl]	Fluorometricky [ng/μl]	Pomer rozdielu
Brokolica	3263	87	38x
Repa	106	52	2x
Mrkva	19	2	10x
Paprika	507	183	3x

Fluorimetricky bola zistená niekoľko krát nižšia koncentrácia DNA než u UV spektrofotometrií. Rozdiel bol 38krát až do 2krát nižší v závislosti na pôvode DNA.

## 5.6 Amplifikácia v PCR a štiepenie produktov PCR (metóda CTAB)

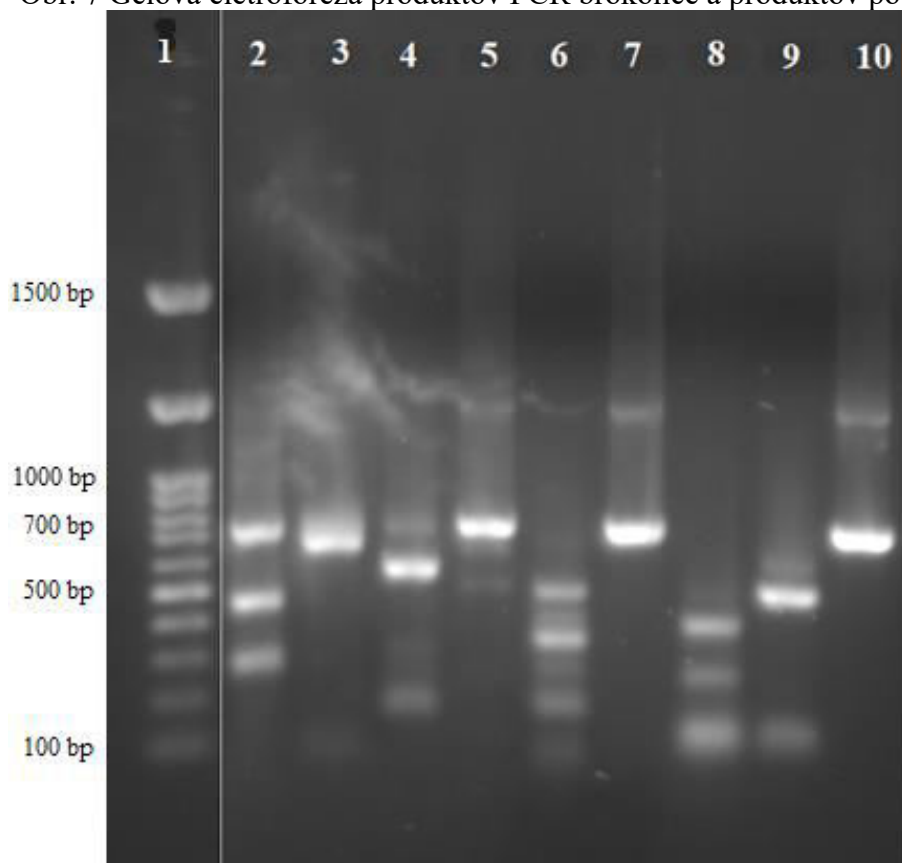
Amplifikácia bola spravená podľa metódy 4.5. Pre štiepenie PCR produktov boli použité enzýmy *EcoRV*, *Sau3AI*, *MseI*, *HaeIII*, *SphI*, *RsaI*, *TaqI* a *Tsp45I*.

### 5.6.1 Brokolica

#### 5.6.1.1 PCR a analýza produktu PCR

DNA bola amplifikovaná v PCR a bol detegovaný produkt PCR (obr 7, beh č. 10). Špecifita produktov PCR bola overená štiepením reštriktázami (obr. 7, beh 2-9).

Obr. 7 Gélková elektroforéza produktov PCR brokolice a produktov po štiepení s enzýmami



Číslo behu	DNA	Enzýmy	Detekcia		Približné veľkosti reštrikčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard, rebrík 100bp				
2	Brokolica	<i>Tsp45I</i>	+	+	700, 450 a 280
3	Brokolica	<i>TaqI</i>	+	+	670 a 100
4	Brokolica	<i>RsaI</i>	+	+	550 a 200
5	Brokolica	<i>SphI</i>	+	+	700
6	Brokolica	<i>HaeIII</i>	+	+	500, 340 a 180
7	Brokolica	<i>MseI</i>	+	-	700
8	Brokolica	<i>Sau3AI</i>	+	+	380, 240 a 100
9	Brokolica	<i>EcoRV</i>	+	+	475 a 100
10	Brokolica		+	-	700

+ : detekcia produktov PCR a štiepenia

- : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

#### 5.6.1.2 Bioinformatická analýza brokolice

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom KX709351. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta vyhľadávaných ôsmich rôznych reštriktáz.

10 20 30 40 50  
*Brassica oleracea* 1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
50 ggcgtacactgatgtattcaacgagttcacacottggccgacaggcccg

60 70 80 90 100  
*Brassica oleracea* 51 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
100 gtaatctttgaaatttcacgtgatggggatagatcattgcaattgttgg

110 120 130 140 150  
*Brassica oleracea* 101 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
150 tcttcaacgagggaattcctagtaagcgcgagtcacgcgtcgcgttgact

160 170 180 190 200  
*Brassica oleracea* 151 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
200 acgtccctgccctttgtacacacgcccgtcgtccctaccgattgaatga

210 220 230 240 250  
*Brassica oleracea* 201 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
250 tccggtgaagtgttcggatcgccgcgacgtgggtgggttcgcgcgtctgcga

260 270 280 290 300  
*Brassica oleracea* 251 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
300 cgtcgcgagaagtccactaaaccttatcatttagaggaggagaagtctgt

310 320 330 340 350  
*Brassica oleracea* 301 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
350 aacaagggtttccgtagggtgaacctgcggaaggatcattgtcgtaacctgg

360 370 380 390 400  
*Brassica oleracea* 351 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
400 aaacagaaacgaccgagaacgttgaaacatcactctcgggtggccgggtat

410 420 430 440 450  
*Brassica oleracea* 401 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
450 cttagctgatttcgtgcctaccgattccgtgggttatgcgttcgtcacccgg

460 470 480 490 500  
*Brassica oleracea* 451 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
500 ccagtttcgggttgattgtacgcatacgttccggatatcaccaaacccc

510 520 530 540 550  
*Brassica oleracea* 501 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
550 ggcaagaaaagtgtcaaggaaattcaactaaacagcctgttttcgcaa

560 570 580 590 600

*Brassica oleracea* 551 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 600 cccggagacgggtgtttgttcggaagcagtgctgcaatgtaaagtctaaaa  
 610 620 630 640 650  
*Brassica oleracea* 601 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 650 cgactctcggcaacggatattctcggctctcgcatctgaagaacgtagc  
 660 670 680 690 700  
*Brassica oleracea* 651 gaaatgcgatacttgggtgtgaattgcagaatcccgtagaacctctgctc  
 700  
 710  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*Brassica oleracea* 701 ttgaaacgcaagttgcg 716

Miesta pripojenia primerov:

gegctacactgatgtattcaacgag – 18S\_for

tcgagtctttgaaacgcaagttgcg – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

*Sau3AI* – GATC – 18,82,115,116 a 385 bp

*RsaI* – GTAC – 167, 246 a 303 bp

*HaeIII* – GGCC – 8, 37, 57, 266 a 348 bp

*TaqI* – TCGA – 23, 59 a 634 bp

*Tsp45I* – GTSAC – 274 a 442 bp

*SphI* – GCATGC - neštiepi

*MseI* – TTAA – neštiepi

*EcoRV* – GATATC – 98, 131 a 487 bp

Porovnávaním výsledkov bioinformatickej analýzy s experimentálnym výsledkom štiepenia amplikónov je uvedené v tab. 15.

Tab. 15 porovnanie výsledkov PCR a bioinformatickej analýzy

Enzým	Dĺžka reštrikčných fragmentov (bp)	Dĺžka fragmentov v bioinf. analýze	Približná zhoda výsledkov
<i>Tsp45I</i>	700, 450 a 280	442 a 274	+
<i>TaqI</i>	670 a 100	634, 59 a 23	+
<i>RsaI</i>	550 a 200	303, 246 a 167	+ *
<i>SphI</i>	700	716	+
<i>HaeIII</i>	500, 340 a 180	348, 266, 57, 37 a 8	+ *
<i>MseI</i>	700	716	+
<i>Sau3AI</i>	380, 240 a 100	385, 116, 115, 82 a 18	+ *
<i>EcoRV</i>	475 a 100	487, 131 a 98	+

+ Zhoda

\* pravdepodobne neúplný digest v experimente

- Zhoda sa nenašla

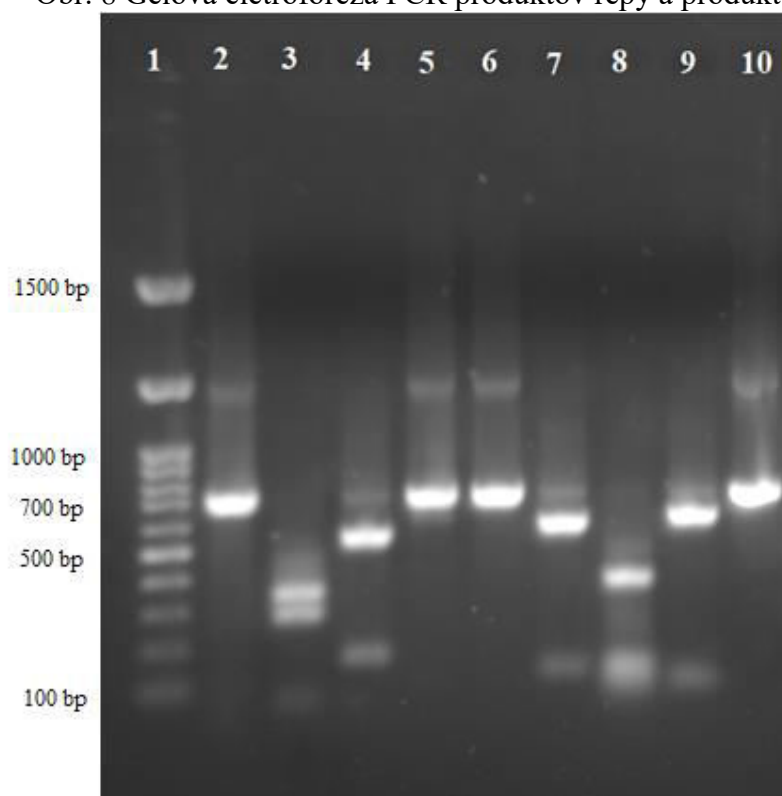
Z brokolice bola metódou CTAB izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR ( asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami . Experimentálne výsledky a *in silico* štiepenie boli v približnej zhode.

## 5.6.2 Repa červená

### 5.6.2.1 PCR a analýza produktu PCR

DNA bola amplifikovaná v PCR a bol detegovaný produkt PCR (obr. 8, beh č. 10). Špecifita produktov PCR bola overená štiepením reštriktázami (obr. 8, behy č 2-9).

Obr. 8 Gélková elektroforéza PCR produktov repy a produktov po štiepení s enzýmami



Číslo behu	DNA	Enzýmy	Detekcia		Približné veľkosti reštriktčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard, rebrík 100 bp				
2	Repa	<i>Tsp45I</i>	+	-	700
3	Repa	<i>TaqI</i>	+	+	380, 300 a 100
4	Repa	<i>RsaI</i>	+	+	575 a 190
5	Repa	<i>SphI</i>	+	-	700
6	Repa	<i>HaeIII</i>	+	-	700
7	Repa	<i>MseI</i>	+	+	600 a 160
8	Repa	<i>Sau3AI</i>	+	+	400 a 143
9	Repa	<i>EcoRV</i>	+	+	640 a 129
10	Repa		+	-	700



- + : detekcia produktov PCR a štiepenia
- : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

### 5.6.2.2 Bioinformatická analýza repy

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom HE577334. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta vyhl'adávaných ôsmich rôznych reštriktáz.

		10	20	30	40	50	
<i>Beta vulgaris</i>	1	...	...	...	...	...	50
		GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCG					
		60	70	80	90	100	
<i>Beta vulgaris</i>	51	...	...	...	...	...	100
		GGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTTGCAATTGTTG					
		110	120	130	140	150	
<i>Beta vulgaris</i>	101	...	...	...	...	...	150
		GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC					
		160	170	180	190	200	
<i>Beta vulgaris</i>	151	...	...	...	...	...	200
		TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG					
		210	220	230	240	250	
<i>Beta vulgaris</i>	201	...	...	...	...	...	250
		ATCCGGTGAAATGTTCCGATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCG					
		260	270	280	290	300	
<i>Beta vulgaris</i>	251	...	...	...	...	...	300
		ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG					
		310	320	330	340	350	
<i>Beta vulgaris</i>	301	...	...	...	...	...	350
		TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGGATCATTTGGATCTG					
		360	370	380	390	400	
<i>Beta vulgaris</i>	351	...	...	...	...	...	400
		CAAAGCAGAGCAACCAGCGAACATGTTTTACATCTGTGGGACGGGGGTGC					
		410	420	430	440	450	
<i>Beta vulgaris</i>	401	...	...	...	...	...	450
		TGGCGCGATGCTTTGGGTTGTGCCAGCCCCCTCCCCCATGTTCGCGGGGCAC					
		460	470	480	490	500	
<i>Beta vulgaris</i>	451	...	...	...	...	...	500
		TCCTACTTGGTTTGCTCCCCGGCGAAAAAAACAAACCAACGGCGCTTACTG					
		510	520	530	540	550	
<i>Beta vulgaris</i>	501	...	...	...	...	...	550
		CGCCAAGGAACATGAAAAGGAGTGTGCTGTCTTATGCATCGGTTTGCCG					
		560	570	580	590	600	
<i>Beta vulgaris</i>	551	...	...	...	...	...	600
		GTGCGGGGATGTGGCACCCAGTATTAGAGATAAAACGACTCTCGGCAAC					

610 620 630 640 650  
 Beta vulgaris 601 GGATATCTCGGCTCTCGCATCG TGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTT 650  
 660 670 680 690 700  
 Beta vulgaris 651 GGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG GTCTTTGAACGCAAGTTG 700  
 ..  
 Beta vulgaris 701 CG 702

Miesta pripojenia primerov:

**GGCTACACTGATGTATCAACGAG** – 18S\_for

**TCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

*Sau3AI* – **GATC** – 18, 83, 116, 116 a 369 bp

*RsaI* – **GTAC** – 168 a 534 bp

*HaeIII* – **GGCC** – 8, 38 a 656 bp

*TaqI* – **TCGA** – 23, 59, 278 a 342 bp

*Tsp45I* – **GTSAC** – neštiepi

*SphI* – **GCATGC** - neštiepi

*MseI* – **TTAA** – 128 a 574 bp

*EcoRV* – **GATATC** – 98 a 604 bp

Porovnávaním výsledkov bioinformatickej analýzy s experimentálnym výsledkom štiepenia je uvedené v tab. 16.

Tab. 16 Porovnanie výsledkov štiepenia amplicónu a bioinformatickej analýzy

Enzým	Dĺžka reštrikčných fragmenov (bp)	Dĺžka fragmentov v bioinf. Analýze (bp)	Približná zhoda výsledkov
<i>Tsp45I</i>	700	702	+
<i>TaqI</i>	380, 300 a 100	342, 278, 59 a 23	+
<i>RsaI</i>	575 a 190	534 a 168	+
<i>SphI</i>	700	702	+
<i>HaeIII</i>	700	656, 38 a 8	+
<i>MseI</i>	600 a 160	574 a 128	+
<i>Sau3AI</i>	400 a 143	369, 116, 116, 83 a 18	+
<i>EcoRV</i>	640 a 129	604 a 98	+

+ Zhoda

- Zhoda sa nenašla

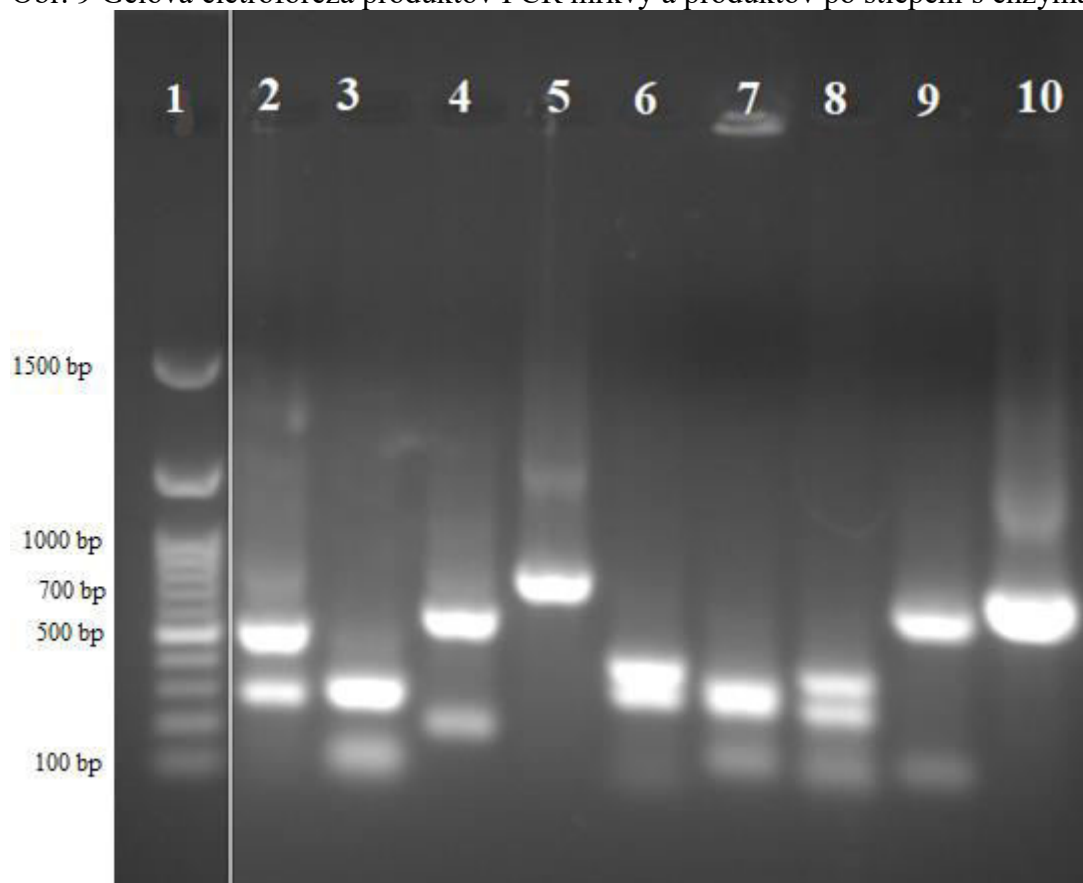
Z repy bola metódou CTAB izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR (asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami. Experimentálne výsledky a *in silico* štiepenie boli v približnej zhode.

### 5.6.3 Mrkva obecná

#### 5.6.3.1 PCR a analýza produktu PCR

DNA bola amplifikovaná v PCR a bol detegovaný produkt PCR (obr. 9, beh č. 10). Špecifita produktov PCR bola overená štiepením reštriktázami (obr. 9, behy č. 2-9).

Obr. 9 Gélová elektroforéza produktov PCR mrkvy a produktov po štiepení s enzýmami



Číslo behu	DNA	Enzým	Detekcia		Približné veľkosti reštrikčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard				
2	Mrkva	<i>Tsp45I</i>	+	+	530 a 350
3	Mrkva	<i>TaqI</i>	+	+	325 a 150
4	Mrkva	<i>RsaI</i>	+	+	600 a 240
5	Mrkva	<i>SphI</i>	+	-	720
6	Mrkva	<i>HaeIII</i>	+	+	433, 350 a 175
7	Mrkva	<i>MseI</i>	+	+	325 a 170
8	Mrkva	<i>Sau3AI</i>	+	+	375, 350 a 150
9	Mrkva	<i>EcoRV</i>	+	+	650
10	Mrkva		+	-	720

+ : detekcia produktov PCR a štiepenia

- : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

### 5.6.3.2 Bioinformatická analýza

Pre túto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom AY552527 a pre 18S kódujúcu oblasť ze sekvencie rajčiny X51576. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta vyhl'adávaných ôsmich rôznych reštriktáz.

```

          10      20      30      40      50
Daucus_carota 1  GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCG 50
          60      70      80      90     100
Daucus_carota 51  GGTAAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG 100
          110     120     130     140     150
Daucus_carota 101 GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC 150
          160     170     180     190     200
Daucus_carota 151 TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG 200
          210     220     230     240     250
Daucus_carota 201 ATCGCGTGAAATGTTCCGATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCG 250
          260     270     280     290     300
Daucus_carota 251 ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG 300
          310     320     330     340     350
Daucus_carota 301 TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGGATCATTTCCATCCT 350
          360     370     380     390     400
Daucus_carota 351 GTGATACCGAATGACTTGTTAAACATGTAACAACAACGGGCAAGCAACTG 400
          410     420     430     440     450
Daucus_carota 401 TGGCCCTTTGGTCCCCTGCTGTGAACCCAAGGCAGGTGTCACCTTATGG 450
          460     470     480     490     500
Daucus_carota 451 TTCCCCTCGCCTAATAAAATCAACTGGGCGCTAGATGCGCCAAGGAAGTA 500
          510     520     530     540     550
Daucus_carota 501 AATAATGAATTGTTCGTTTCGTTTCGTCGGGAAAGTGGCGGCGGTCC 550
          560     570     580     590     600
Daucus_carota 551 AAAACACAAGCGGACGTGTGCTTCTCTTATAAATAAAATTAATCTCTCGGC 600
          610     620     630     640     650
Daucus_carota 601 AATGGATATCTTGGCTCTCGTATTGATGAAAAACATAGTGAAATACAATA 650

```

660                  670                  680                  690                  700

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

*Daucus\_carota* 651 CTTGGTGTGAATTGCAGAATCTCGTGAACCAATTGACTCTTTGAACGCAAG 700

....|

*Daucus\_carota* 701 TTGCG 705

Miesta pripojenia primerov:

**GGCGTACACTGATGTATTCAACGAG** – 18S\_for

**TCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

*Sau3AI* – **GATC** – 18, 83, 116, 116 a 372 bp

*RsaI* – **GTAC** – 168 a 537 bp

*HaeIII* – **GGCC** – 8, 38, 301 a 358 bp

*TaqI* – **TCGA** – 342 a 363 bp

*Tsp45I* – **GTSAC** – 267 a 438 bp

*SphI* – **GCATGC** - neštiepi

*MseI* – **TTAA** – 335 a 370 bp

*EcoRV* – **GATATC** – 98 a 607 bp

Porovnávaním výsledkov bioinformatickej analýzy s experimentálnym výsledkom štiepenia je uvedené v tab. 17.

Tab. 17 porovnanie výsledkov PCR a bioinformatickej analýzy

Enzým	Dĺžka reštrikčných fragmentov (bp)	Dĺžka fragmentov v bioinf. analýze	Približná zhoda výsledkov
<i>Tsp45I</i>	530 a 350	438 a 267	-
<i>TaqI</i>	325 a 150	363 a 342	+
<i>RsaI</i>	600 a 240	537 a 168	-
<i>SphI</i>	720	705	+
<i>HaeIII</i>	433, 350 a 175	358, 301, 38 a 8	-
<i>MseI</i>	325 a 170	370 a 335	+
<i>Sau3AI</i>	375, 350 a 150	372, 116, 116, 83 a 18	+
<i>EcoRV</i>	650	607 a 98	+

+ Zhoda

- Zhoda sa nenašla

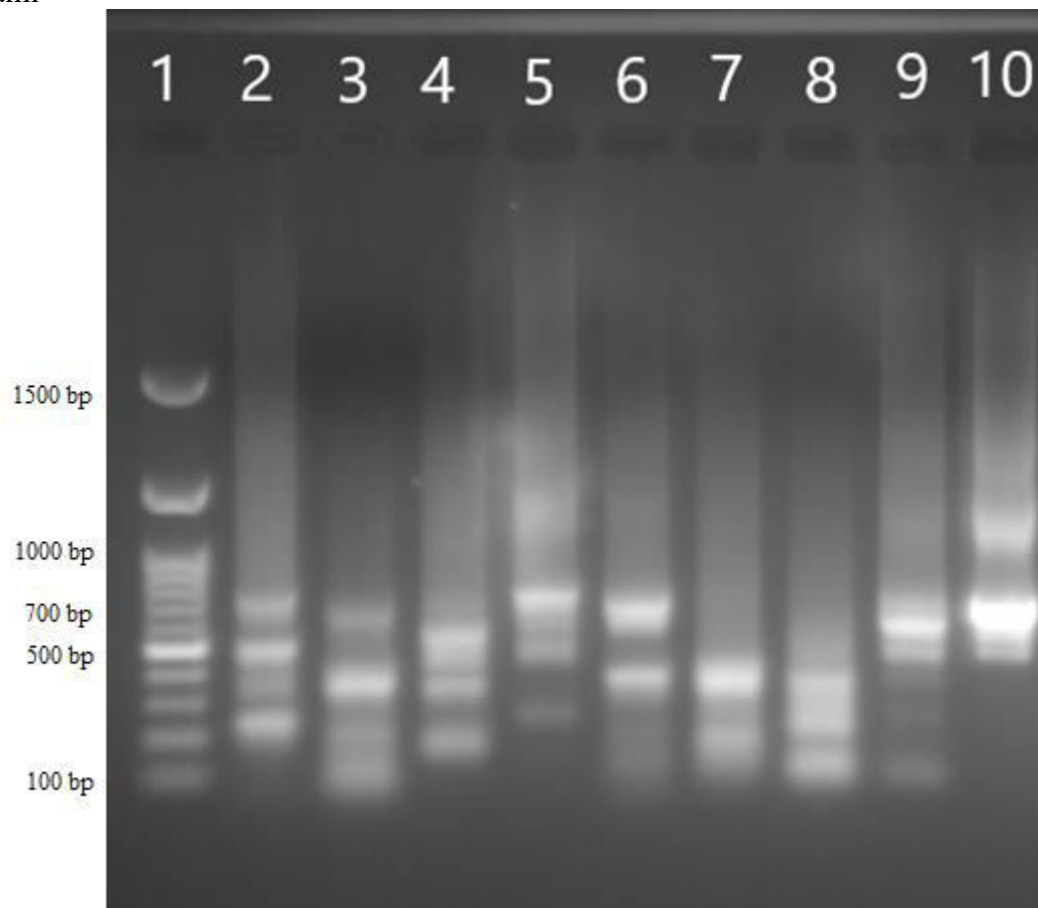
Z mrkvy bola metódou CTAB izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR (asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami. Experimentálne výsledky a in silico štiepenie boli v približnej zhode.

## 5.6.4 Paprika

### 5.6.4.1 PCR a analýza produktov PCR

DNA bola amplifikovaná v PCR a bol detegovaný produkt PCR (obr 10, beh č. 10). Špecifita produktov PCR bola overená štiepením reštriktázami (obr. 10, behy č. 2-9).

Obr. 10 Gélková elektroforéza produktov papriky a produktov po štiepení s enzýmami



Číslo behu	DNA	Enzým	Detekcia		Približné veľkosti reštrikčných fragmentov (bp)
			Produkt PCR	Štiepenie	
1	DNA štandard, rebrík 100 bp				
2	Paprika	<i>Tsp45I</i>	+	+	725, 470, 350 a 220
3	Paprika	<i>TaqI</i>	+	+	600, 350, 220 a 120
4	Paprika	<i>RsaI</i>	+	+	530, 350 a 183
5	Paprika	<i>SphI</i>	+	+	725, 500 a 260
6	Paprika	<i>HaeIII</i>	+	+	650 a 350
7	Paprika	<i>MseI</i>	+	+	375 a 200
8	Paprika	<i>Sau3AI</i>	+	+	375, 260 a 130
9	Paprika	<i>EcoRV</i>	+	+	600
10	Paprika		+	-	725

- + : detekcia produktov PCR a štiepenia  
 - : produkty PCR neboli detegované alebo štiepené

#### 5.6.4.2 Bioinformatická analýza papriky

Pre tuto analýzu boli použité údaje zo stránky NCBI, ktoré sú pod prístupovým číslom JQ885438. Vyznačené sú miesta pripojenia primerov a cieľové miesta vyhl'adávaných ôsmich rôznych reštriktáz.

```

      10      20      30      40      50
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 1  GCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTTTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCG 50

      60      70      80      90      100
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 51 GGTAACTCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG 100

      110     120     130     140     150
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 101 GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC 150

      160     170     180     190     200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 151 TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG 200

      210     220     230     240     250
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 201 ATCCGGTGAAATGTTTCGGAATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCG 250

      260     270     280     290     300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 251 ACGTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCG 300

      310     320     330     340     350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 301 TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGCTGTAGGTGA 350

      360     370     380     390     400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 351 ACCTGCGGAAGGATCATTGTCAAAAACCTGCATAGCAGAATGACCCACGA 400

      410     420     430     440     450
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 401 ACGTGTTTTAACAACTGGGGAGCCACGTTGGCAGAGTGCTTCAGCCCTCA 450

      460     470     480     490     500
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 451 GCACGAGAACCTTCCCTCGTCCTCGGTGCATGCAACCACTAGCGCGTCG 500

      510     520     530     540     550
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Capsicum annuum 501 GGCAGACTAATGAACCCCAACGCGAAAAGCACCAGGAATACCTTAATTGA 550

      560     570     580     590     600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

```

*Capsicum annum* 551 CAGCCTGCACCTCACTCTCCATTCTGGCGTGTATCAAGCGGACGTGTGC 600

610 620 630 640 650  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annum* 601 TTCTCTTATAAAATAAAATTACTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGT 650

660 670 680 690 700  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annum* 651 ATTGATGAAAAACATAGTGAAATACAATACTTGGTGTGAATTGCAGATC 700

710 720 730  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|

*Capsicum annum* 701 TCGTGAACCAATTGACTCTTTGAACGCAAGTTGCG 734

Miesta pripojenia primerov:

**GGCGTACACTGATGTATTC AACGAG** – 18S\_for

**TCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG** – 5,8S\_rev

Štiepne miesta reštrikčných enzýmov a veľkosti fragmentov:

Sau3AI – **GATC** – 18, 29, 83, 115, 116 a 373 bp

RsaI – **GTAC** – 168, 244 a 322 bp

HaeIII – **GGCC** – 8, 38, 156, 532 bp

TaqI – **TCGA** – neštiepi

Tsp45I – **GTSAC** – neštiepi

SphI – **GCATGC** - 252 a 482 bp

MseI – **TTAA** – 135, 192 a 407 bp

EcoRV – **GATATC** – 98 a 636 bp

Porovnávaním výsledkov bioinformatickej analýzy s experimentálnym výsledkom štiepenia je uvedené v tab. 18.

Tab. 18 porovnanie výsledkov PCR a bioinformatickej analýzy

Enzým	Dĺžka reštrikčných fragmentov (bp)	Dĺžka fragmentov v bioinf. analýze	Približná zhoda výsledkov
<i>Tsp45I</i>	725, 470, 350 a 220	734	-
<i>TaqI</i>	600, 350, 220 a 120	734	-
<i>RsaI</i>	530, 350 a 183	322, 244 a 168	+
<i>SphI</i>	725, 500 a 260	482 a 252	+
<i>HaeIII</i>	650 a 350	532, 156, 38 a 8	-
<i>MseI</i>	375 a 200	407, 192 a 135	+
<i>Sau3AI</i>	375, 260 a 130	373, 116, 115, 83, 29 a 18	+
<i>EcoRV</i>	600	636, 98	+



- + Zhoda
- Zhoda sa nenašla

Z papriky bola metódou CTAB izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná v PCR. Produkt PCR (asi 700 bp) bol štiepený reštriktázami. Experimentálne výsledky a in silico štiepenie boli v približnej zhode.

### 5.7 Porovnanie reštrikčnej analýzy produktov PCR

Úlohou bolo nájsť rozdiely v cieľových miestach pre reštriktázy medzi produktami PCR získanými s primermi 18S\_for a 5,8S\_rev. Tieto produkty boli získane po amplifikácii DNA z izolátov z rôznych druhov zeleniny (brokolica, repa, mrkva a paprika). Porovnali sa výsledky z 5.6.1 až 5.6.4 a rozdielnosti v dĺžkach reštrikčných fragmentov získaných po štiepení amplicónu enzýmami. Odlišnosti pre jednotlivé páry skúmaných produktov PCR sa dali do tab. 19.

Tab. 19 Porovnanie reštriktáz z 5.6.1 až 5.6.4 vyjadrene v rozdielnosti cieľových miest enzýmov v amplicónoch

Produkt PCR	Repa	Mrkva	Paprika
Brokolica	<i>EcoRV, MseI, HaeIII, TaqI, Tsp45I, RsaI</i>	<i>EcoRV, MseI, TaqI, RsaI</i>	<i>EcoRV, MseI, SphI, TaqI, Tsp45I, HaeIII</i>
Repa		<i>MseI, HaeIII, Tsp45I</i>	<i>MseI, HaeIII, SphI, RsaI, TaqI</i>
Mrkva			<i>MseI, HaeIII, SphI, RsaI, TaqI, Tsp45I</i>

Tabuľka môže slúžiť ako návod pre rozlíšenie stanovených druhov zeleniny pomocou genetickej analýzy. Napríklad s použitím enzýmu *EcoRV* jasne identifikujeme brokolicu na pozadí repy, mrkvy alebo papriky.

## 5.8 Porovnanie metód izolácie DNA

Porovnanie izolácie DNA magnetickými časticami a metódou CTAB je uvedené v tab. 20.

Tab. 20. Porovnanie metód izolácie

Metóda izolácie	Množstvo rastlinnej tkáňe	Koncentrácia DNA (ng/ml) (UV spektr.)	Amplifikovateľnosť v PCR	Doba izolácie
Magnetické častice	500mg	1,2-11,7	+	5 hodín
CTAB	5g	19-3262	+	2 dni

Oboma metódami bola izolovaná DNA v dostatočnom množstve a v kvalite pre PCR. Metóda s magnetickými časticami je omnoho rýchlejšia a jednoduchšia. Avšak s metódou CTAB je možné izolovať väčšie množstvo DNA.

## **6. DISKUSIA**

### **6.1 Izolácia DNA vhodná pre PCR**

Cieľom izolácie DNA zo vzoriek zeleniny (brokolica, repa, mrkva, paprika) bolo získať DNA vo vysokej čistote a v množstve vhodnom pre PCR. Tieto druhy zeleniny obsahujú veľké množstvo polyfenolov, sacharidov, bielkovín a ďalších látok, ktoré môžu ovplyvňovať ďalšiu prácu s touto DNA. Často pôsobia ako inhibítory PCR, v prípade ak sú koextrahované s DNA. [36] Pre izoláciu na DNA sme použili dve metódy a to metóda za použitia magnetických častíc a metóda CTAB.

#### **6.1.1 Izolácia DNA metódou magnetických častíc**

Výsledky prvej metódy sú v tab. 10 až 13, kde môžeme vidieť že koncentrácia izolovanej DNA u tejto metódy je nízka a pohybuje sa od 1,2–11,7 ng/ml. Aj na grafoch 1 a 2 vidíme, že koncentrácia nie je vysoká keďže píky v oblasti vlnovej dĺžky 260 nm nedosahujú vysokej výšky alebo nebol detegovaný žiadny pík. V tomto prípade sa teda výsledná koncentrácia vzorky mohla získať meraním pozadia, čiže kontaminácie. Zároveň z tabuliek 10 až 13 môžeme vidieť v predposlednom stĺpci, kde máme pomer vlnových dĺžok 260 a 280 nm, že DNA je kontaminovaná. Čistá DNA by mala hodnotu 1,8. Všetko čo už je 1,9 a vyššie môžeme povedať, že je kontaminované RNA alebo organickými látkami [37]. Hodnoty, ktoré sú menšie ako 1,7 nám napovedajú o znečistení proteínmi. Z literatúry je známe [23,24,26], že pomocou magnetických častíc sa dá izolovať DNA v kvalite vhodnej pre PCR z rôznych typov komplexných vzoriek, ktoré obsahujú inhibítory PCR. To sa potvrdilo i v tejto práci. Podarilo sa získať dostatočne čistú DNA a o vhodnej koncentrácii, aby sa PCR produkt naamplifikoval, čo dokazujú obrázky 5 a 6.

#### **6.1.2 Izolácia DNA metódou CTAB**

Metóda CTAB používaná pre izoláciu DNA z rastlinných tkanív má mnoho variant [8,16,17,36]. V tejto práci bola použitá metóda Dr. Kovaříka (osobne povedané). Pre metódou s CTAB sme koncentráciu DNA merali na UV spektrofotometri a na fluorometri. Hodnoty výsledných koncentrácií DNA a porovnania stanovení sa nachádzajú v tabuľke 5.5. Meranie ukázalo rozdiely. Najčistejšia DNA medzi vybranými zeleninami bola izolovaná z repy a papriky. DNA izolovaná z brokolice bola na tom je najhoršie, rozdiel bol mnohonásobný. To sa aj experimentálne potvrdilo, keďže neriedená DNA brokolice mala omnoho väčšiu hustotu oproti ostatným vzorkám. Hustotu pravdepodobne spôsobila koextrakcia polysacharidov [36]. Pre tento prípad úplne stačilo vzorky DNA nariediť (DNA z brokolice až 100násobne) a boli vhodné na použitie pre PCR.

#### **6.1.3 Porovnanie metód izolácie**

V oboch metódach sa podarilo vyizolovať dostatočné množstvo DNA pre využitie v PCR. Avšak ako môžeme vidieť v tab. 20, tak každá metóda má určité výhody a aj nevýhody ako je napríklad čas trávený izoláciou, koncentrácia alebo čistota DNA. Zároveň by sa dalo uvažovať aj o nákladoch na jednu vzorku, čo by určite metóda s magnetickými časticami mala nižšie. Ani jednu z týchto techník nevieme označiť za najlepšiu či najhoršiu. Na výbere techniky záleží len

na vóli pracovníka a na zariadení laboratória. Tieto výsledky sú v súlade s publikovanými výsledkami [36].

## 6.2 PCR, detekcia produktov DNA a ich štiepenie

Ďalším zameraním tejto práce boli vyizolované vzorky DNA použiť pre PCR. Pre obe metódy a aj pre všetky DNA z vybraných druhov zeleniny sa podarilo naamplifikovať časť génu pre 35S rDNA. Veľkosť produktu PCR bola asi 700 bp a bola v súlade s predpokladanými a publikovanými výsledkami [38]. Následne sa tieto produkty PCR podrobili enzymatickému štiepeniu za pomoci reštrikčných endonukleáz typu II. PCR produkty a ich štiepenia (reštrikčné fragmenty) boli následne detegované pomocou gélovej elektroforézy (obr. 5 až 10). Na obrázkoch vidíme aký bol priebeh v jednotlivých behoch. Krátke fragmenty (pod 150 bp) sa u niektorých vzorkách nemusia detegovať. Pravdepodobný dôvod je nízke rozlíšenie elektroforézy alebo boli nízke hodnoty intenzity fluorescence. Po amplifikácii a štiepení produktov PCR sme odčítali z fotiek (obr. 4 až 10) gélu jednotlivé veľkosti reštrikčných fragmentov. Enzymy boli vyhľadané pomocou bioinformatickej analýzy.

## 6.3 Bioinformatická analýza PCR produktov (*in silico* analýza)

V databázi NCBI sa vyhľadali jednotlivé sekvencie rDNA a podrobili sa bioinformatickej analýze. To znamená, že sa jednotlivé sekvencie (ak bolo potrebné tak sa upravili v programe BioEdit) vložili do webovej stránky NEBcutter. Táto stránka po vložení sekvencie ukázala všetky známe štiepne miesta enzýmov, ktoré sú momentálne na trhu. Na štiepenie PCR produktu sa využívalo týchto osem enzýmov: *EcoRV*, *Sau3AI*, *MseI*, *HaeIII*, *SphI*, *RsaI*, *TaqI* a *Tsp45I*.

Porovnanie bioinformatickej analýzy a experimentálneho štiepenia produktov PCR u brokolice ukázalo, že hodnoty oboch analýz sa približne zhodujú (tab.15). Avšak pri niektorých enzýmoch ako je napríklad *HaeIII*, *RsaI* alebo *Tsp45I* môžeme spozorovať, že sa niektoré PCR produkty nerozštiepili na 100%, došlo k čiastočnému štiepeniu (parciálny digest). Mohlo sa stať, že použitý enzým bol inhibovaný nejakým zvyškovým kontaminantom vo vzorke DNA. Negatívne štiepenie môže byť spôsobené mutáciou v cieľovom mieste, ktoré rozpoznáva reštriktáza (Dr. Kovařík osobne povedané).

Rovnako ako brokolice sa výsledky oboch analýz u repy (reštrikčná aj bioinformatická) približne zhodujú. Tieto hodnoty môžeme nájsť v tab. 16.

Výsledky analýz produktov PCR získaných z mrkvy (tab.17) sa u väčšiny enzýmov zhoduje, avšak sa nájdu enzýmy ako sú *HaeIII*, *RsaI* alebo *Tsp45I*, kde je dĺžka reštrikčných fragmentov stanovená experimentálne a *in silico* analýzou odlišná. Môže to byť podobný problém ako u produktov PCR amplifikovaného z DNA brokolice.

Aj u papriky sa väčšina analýz zhoduje, len u *HaeIII*, *TaqI* a *Tsp45I* sú odlišné hodnoty veľkosti fragmentov. Avšak pre *TaqI* a *Tsp45I*, kde bioinformatická analýza ukazuje, že v tieto reštrikčné enzýmy nemajú v amplikóne štiepne miesta, bolo experimentálne dokázané štiepenie. Všetky hodnoty analýz pre produkty PCR papriky sa nachádzajú v tab. 18.

Sporné výsledky by sa dali overiť sekvencovaním.

#### 6.4 Celkové porovnanie analýz medzi produktami PCR

Výsledky analýz sa porovnali medzi produktami PCR a odlišnosti medzi jednotlivými pármami sme dali do tab. 19. Z tabuľky sa môžu získať informácie ako správne odlíšiť jednotlivé druhy zeleniny medzi sebou. Restriktčný enzým *MseI* je podľa výsledkov porovnávania analýz univerzálnym enzýmom, ktorý nám odlíši produkty PCR testovaných druhov zeleniny. Zároveň enzým *EcoRV* je špecifický pre PCR produkt brokolice, čím by sa dal použiť pre odlíšenie od ostatných produktov PCR. Rovnako na tom je aj amplikón z papriky, ak by sa použil enzým *SphI*, ktorý produkt PCR z papriky neštípi ale produkty z PCR z ostatných plodín áno.

Táto metóda sa ďalej bude testovať pre amplifikáciu DNA zo zmesi uvedených druhov zeleniny a pre dôkaz týchto druhov v potravinách.

## 7. ZÁVER

Metódou s magnetickými časticami a CTAB metódou bola izolovaná DNA, ktorá sa amplifikovala v PCR. PCR produkt získaný po amplifikácii DNA s primérmi 18S\_for a 5,8S\_rev (oblasť ITS1) je vhodný pre odlišenie pôvodu DNA zo zeleniny: brokolica, repa, mrkva a paprika s využitím reštrikčných enzýmov.

## 8. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] GALIMBERTI, Andrea, Fabrizio DE MATTIA, Alessia LOSA, Ilaria BRUNI, Silvia FEDERICI, Maurizio CASIRAGHI, Stefano MARTELOS a Massimo LABRA. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* [online]. 2013, **50**(1), 55-63 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.09.036. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691200395X>
- [2] HEBERT, Paul D.N., Sujeewan RATNASINGHAM a Jeremy R. DE WAARD. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 2003, **270**(suppl\_1) [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025. ISSN 1471-2954. Dostupné z: <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2003.0025>
- [3] GREGORY, T. Ryan. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* [online]. 2005, **434**(7037), 1067-1067 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1038/4341067b. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/4341067b>
- [4] STEWART, C. Neal. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. *Trends in Plant Science* [online]. 2005, **10**(8), 390-396 [cit. 2019-05-09]. ISSN 13601385. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138505001470>
- [5] HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN a W. HALLWACHS. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, **101**(41), 14812-14817 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1073/pnas.0406166101. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406166101>
- [6] VALENTINI, ALICE, CHRISTIAN MIQUEL, MUHAMMAD ALI NAWAZ, et al. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trn L approach. *Molecular Ecology Resources* [online]. 2009, **9**(1), 51-60 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x. ISSN 1755098X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x>
- [7] SLAVIN, Joanne L. a Beate LLOYD. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition* [online]. 2012, **3**(4), 506-516 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.3945/an.112.002154. ISSN 2156-5376. Dostupné z: <https://academic.oup.com/advances/article/3/4/506/4591497>
- [8] BRANHAM, Sandra E., Zachary J. STANSELL, David M. COUILLARD a Mark W. FARNHAM. Quantitative trait loci mapping of heat tolerance in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using genotyping-by-sequencing. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 2017, **130**(3), 529-538 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1007/s00122-016-2832-x. ISSN 0040-5752. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00122-016-2832-x>
- [9] BJORKMAN, T. a K. J. PEARSON. High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Journal of Experimental Botany* [online]. 1998, **49**(318), 101-106 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1093/jxb/49.318.101. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/49.318.101>
- [10] MAHN, Andrea a Alejandro REYES. An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and the effect of processing. *Food Science and Technology International* [online]. 2012, **18**(6), 503-514 [cit. 2019-05-09]. DOI:

10.1177/1082013211433073. ISSN 1082-0132. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1082013211433073>

[11] NINFALI, Paolino a Donato ANGELINO. Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra. *Fitoterapia* [online]. 2013, **89**, 188-199 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.06.004. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X13001585>

[12] HARVESON, R. M, L. PANELLA, a R. T. LEWELLEN. Introduction - History of Beet Production and Usage. Pages 1-2 *In*: Compendium of Beet Diseases and Insects, edited by R. M. Harveson, L. E. Hanson, and G. L. Hein, eds. APS Press, St.Paul, MN, pp. 140. 2009.

[13] SHARMA, Krishan Datt, Swati KARKI, Narayan Singh THAKUR a Surekha ATTRI. Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2012, **49**(1), 22-32 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1007/s13197-011-0310-7. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0310-7>

[14] KHAN, Farhan A., Tariq MAHMOOD, Muhammad ALI, Abdul SAEED a Aneela MAALIK. Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: Capsicum annuum L. *Natural Product Research* [online]. 2014, **28**(16), 1267-1274 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1080/14786419.2014.895723. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.895723>

[15] JADON, Kuldeep Singh, Rakesh SHAH, Hari Narayan GOUR a Pankaj SHARMA. Management of blight of bell pepper (Capsicum annuum var. grossum) caused by Drechslera bicolor. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2016, **47**(4), 1020-1029 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.032. ISSN 15178382. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216307663>

[16] SANGWAN, N.S., R.S. SANGWAN a Sushil KUMAR. Isolation of genomic DNA from the antimalarial plant *Artemisia annua*. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. **16**(4), 365-365 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1023/A:1007545102889. ISSN 07359640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007545102889>

[17] SAHU, Sunil Kumar, Muthusamy THANGARAJ a Kandasamy KATHIRESAN. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology* [online]. 2012, **2012**, 1-6 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.5402/2012/205049. ISSN 2090-7907. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/205049/>

[18] WEISHING K., H. NYBOM, K WOLFF a W. MEYER. DNA isolation and purification. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. pp. 1995, 44–59, CRC Press, Boca Raton,

[19] XIN, Z.; CHEN, J. DNA sequencing II: optimizing preparation and cleanup. *Extraction of Genomic DNA from Plant Tissue*, 2006, 47: 59.

[20] SAIYED, ZM, SD TELANG a CN RAMCHAND. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *BioMagnetic Research and Technology* [online]. **1**(1) [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1186/1477-044X-1-2. ISSN 1477044X. Dostupné z: <http://biomagres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-044X-1-2>



[21] RAMCHAND, C N, Priyadarshini PANDE, Peter KOPCANSKY a R V MEHTA. *Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology* [online]. 2014-02-19, , 683-686 [cit. 2019-05-09]. ISSN 0975-1041. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/123456789/26700>

[22] ŠAFARIKOVÁ, M. a I. ŠAFARIK. The Application of Magnetic Techniques in Biosciences. *Magnetic and Electrical Separation* [online]. 2001, **10**(4), 223-252 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1155/2001/57434. ISSN 1055-6915. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/archive/2001/057434/abs/>

[23] ŠAFARIK, I. a M. ŠAFARIKOVÁ. Overview of magnetic separations used for biochemical and biotechnological applications. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* Edited by: Hafeli U, Schutt W, Teller J, Zborowski M. New York: Plenum Press; 1997:323-340.

[24] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>

[25] DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.2147/IJN.S1608. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>

[26] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **73**(3), 495-504 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>

[27] HOLDEN, Marcia J., Ross J. HAYNES, Savelas A. RABB, Neena SATIJA, Kristina YANG a Joseph R. BLASIC. Factors Affecting Quantification of Total DNA by UV Spectroscopy and PicoGreen Fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, **57**(16), 7221-7226 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1021/jf901165h. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf901165h>

[28] SINGER, Victoria L., Laurie J. JONES, Stephen T. YUE a Richard P. HAUGLAND. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* [online]. 1997, (249), 228-23 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/b2b7/290fe46cb0cb64d3a0d96572b5724f6c37e6.pdf>

[29] HEBERT, Paul D. N., Alina CYWINSKA, Shelley L. BALL a Jeremy R. DEWAARD. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 2003, **270**(1512), 313-321 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218. ISSN 1471-2954. Dostupné z: <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2002.2218>

[30] LI, Xiwen, Yang YANG, Robert J. HENRY, Maurizio ROSSETTO, Yitao WANG a Shilin CHEN. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews* [online]. 2015, **90**(1), 157-166 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1111/brv.12104. ISSN 14647931. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12104>

- [31] KOVARIK, A, G WERLEMARK, A R LEITCH, K SOUCKOVA-SKALICKA, Y K LIM, L KHAITOVÁ, B KOUKALOVA a H NYBOM. The asymmetric meiosis in pentaploid dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*) is associated with a skewed distribution of rRNA gene families in the gametes. *Heredity* [online]. 2008, **101**(4), 359-367 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1038/hdy.2008.63. ISSN 0018-067X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/hdy200863>
- [32] ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. PCR – the polymerase chain reaction. *Anal. Methods* [online]. 2014, **6**(2), 333-336 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1039/C3AY90101G. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3AY90101G>
- [33] LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (63) [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.3791/3998. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3998/>
- [34] GUBLER, M., D. BRAGUGLIA, J. MEYER, A. PIEKAROWICZ a T.A. BICKLE. Recombination of constant and variable modules alters DNA sequence recognition by type IC restriction-modification enzymes. *The EMBO Journal* [online]. 1992, **11**(1), 233-240 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05046.x. ISSN 02614189. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05046.x>
- [35] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.3791/3923. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3923/>
- [36] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, **2**(3), 386-392 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [37] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3
- [38] TROJÁNEK, ZDENEK. *Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci*. BRNO, 2013. Diplomová práce. FAKULTA CHEMICKÁ ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ. Vedoucí práce Doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

## 9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

bp	pár bází
CTAB	cetyl trietylamonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IGS	vnútrogenový medzerník
ITS	vnútorná transkribovaná oblasť
TLC	tenkovrstvová chromatografia
PEG	polyetylén glykol
SDS	dodecylsulfát sodný